



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114008077 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 01

(21) 申请号 202080043848.6

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(22) 申请日 2020.07.02

代理人 钱文字 陈扬扬

(30) 优先权数据

62/870,269 2019.07.03 US

62/965,450 2020.01.24 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2020/051588 2020.07.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/001653 EN 2021.01.07

(71) 申请人 牛津生物疗法有限公司

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 A·比什顿 J·奥克罗伊德

权利要求书3页 说明书35页

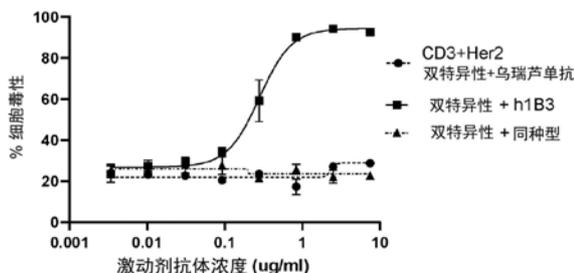
序列表12页 附图11页

(54) 发明名称

抗体和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及针对SLAM家族成员6 (SLAMF6) 也称为NTB-A或CD352的抗体和其它治疗性蛋白质, 编码此类抗体和治疗性蛋白质的核酸, 制备抗体和其它治疗性蛋白质的方法, 以及通过使用针对SLAMF6的抗体和其它治疗性蛋白质来治疗疾病 (例如癌症) 的方法。



1. 一种能结合至SLAMF6的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含:

含有SEQ ID NO:5的CDR-H1序列;
含有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:15的CDR-H2序列;和
含有SEQ ID NO:7的CDR-H3序列。

2. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其还包含轻链可变区,所述轻链可变区包含选自下组的至少一个CDR序列:

CDR-L1序列,其含有选自下组的序列:SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:16;
CDR-L2序列,其含有选自下组的序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:17;和
CDR-L3序列,其含有SEQ ID NO:10。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含:

CDR-L1,其含有SEQ ID NO:5的序列;
CDR-L2,其含有SEQ ID NO:15的序列;和
CDR-L3,其含有SEQ ID NO:7的序列。

4. 如权利要求2或权利要求3所述的抗体或抗原结合片段,其中所述轻链可变区包含:

CDR-L1,其含有SEQ ID NO:16的序列;
CDR-L2,其含有SEQ ID NO:17的序列;和
CDR-L3,其含有SEQ ID NO:10的序列。

5. 一种能够结合SLAMF6的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含:
重链可变区,包括:

含有SEQ ID NO:5的CDR-H1;
含有SEQ ID NO:15的CDR-H2;和
含有SEQ ID NO:7的CDR-H3;和

轻链可变区,包括:

含有SEQ ID NO:16的CDR-L1;
含有SEQ ID NO:17的CDR-L2;和
含有SEQ ID NO:10的CDR-L3;

或其变体,其中所述变体:i) 在所述CDR-H1,所述CDR-H2,所述CDR-H3,所述CDR-L1,所述CDR-L2和所述CDR-L3中的任何一个或多个中独立地具有1,2,3,4,5或6个氨基酸取代,添加和/或缺失;或ii) 在包含所述CDR-H1,所述CDR-H2,所述CDR-H2,所述CDR-H3,所述CDR-L1,所述CDR-L2和所述CDR-L3的CDR组中总共具有1,2,3,4,5,6,7,8,9或10个氨基酸取代,添加和/或缺失。

6. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含:

i) SEQ ID NO:1的3个重链CDR和SEQ ID NO:2的3个轻链CDR,或
ii) SEQ ID NO:13的3个重链CDR和SEQ ID NO:14的3个轻链CDR;
其中CDR由Kabat或Chothia编号系统定义。

7. 一种抗体或其抗原结合片段,包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:13至少约80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的序列,和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:14至少约80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同的序列。

8.如权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,包含

含有SEQ ID NO:13的重链可变区,和含有SEQ ID NO:14的轻链可变区。

9.一种抗体或其抗原结合片段,其能结合至由如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段识别的SLAMF6蛋白上的表位,或其能与如权利要求1-8中任一项所述的抗体交叉竞争结合。

10.如权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其保留如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段的人SLAMF6结合亲和性的至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约91%,至少约92%,至少约93%,至少约94%,至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%或至少约99%。

11.如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是单克隆抗体。

12.如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是嵌合的,人源化的,双特异性的或人抗体或抗原结合片段。

13.如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是Fc沉默的工程改造的IgG1抗体或抗原结合片段,其对于一个或多个Fc受体具有减少的结合或无结合。

14.如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够诱导和/或增强T细胞的细胞毒性。

15.如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自下组:Fab,Fab',F(ab)₂,F(ab')₂,Fv,FV-TCR片段,scFv和单域抗体。

16.一种多核苷酸,其编码:

i) 前述权利要求中任一项所述的抗体或抗原结合片段的重链可变区;
和/或

ii) 前述权利要求中任一项所述的抗体或抗原结合片段的轻链可变区。

17.一种表达载体,其包含至少一种如权利要求16所述的多核苷酸。

18.一种宿主细胞,包括:

i. 包含如权利要求16所述的多核苷酸的表达载体;或

ii. 第一表达载体,其包含编码如权利要求16所述的抗体或其抗原结合部分的重链可变区的多核苷酸,和第二表达载体,其包含编码如权利要求16所述的抗体或其抗原结合部分的轻链可变区的多核苷酸。

19.一种制备抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括:在其中所述抗体或抗原结合片段在如权利要求18所述的宿主细胞中表达的条件下培养所述宿主细胞,和,任选地分离所述抗体或抗原结合片段。

20.一种药物组合物,其包含如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,和药学上可接受的运载体。

21.一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括向所述对象给予有效量的如权利要求1-15或20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或药物组合物。

22. 如权利要求1-15或20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

23. 如权利要求1-15或29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或药物组合物,其用于治疗癌症。

24. 如权利要求21-23中任一项的方法或用途,其中所述癌症选自下组:小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结肠直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸癌,甲状腺癌,骨癌,胆囊和胆管癌,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,胃肠道间质瘤,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

25. 如权利要求21-24中任一项所述的方法或用途,其中所述药物组合物或药物还包含有效量的第二治疗剂。

26. 如权利要求1-15或20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或药物组合物,用于治疗或用作药物。

抗体和使用方法

发明领域

[0001] 本发明涉及能够结合SLAMF6蛋白的抗体及其用途。

[0002] 引言

[0003] 本发明的方面包括针对SLAM家族成员6 (SLAMF6) 也称为NTB-A或CD352的抗体和其它治疗性蛋白质, 编码此类抗体和治疗性蛋白质的核酸, 制备抗体和其它治疗性蛋白质的方法, 以及通过使用针对SLAMF6的抗体和其它治疗性蛋白质来治疗疾病 (例如癌症) 的方法。

背景技术

[0004] 靶抗原SLAMF6是单程I型膜蛋白质, 且是免疫球蛋白超家族和CD2亚家族的成员 (J Exp Med. 2001年8月6日; 194 (3) : 235-46)。其活性受小细胞质衔接蛋白SH2D1A/SAP和/或SH2D1B/EAT-2的存在与否控制。该蛋白质仅在表达高表面密度的天然细胞毒性受体的自然杀伤细胞(NK) 中触发溶细胞活性 (J. Exp. Med. 194: 235-246 (2001))。NK细胞中的阳性信号转导表明VAV1的磷酸化。NK细胞活化似乎取决于SH2D1B而不是SH2D1A。与SLAMF1联合, SLAMF6控制正选择和胸腺细胞自然杀伤T (NKT) 细胞谱系的后续扩增和分化之间的转变。SLAMF6还促进T细胞分化为辅助T细胞Th17表型, 导致IL-17分泌增加; 共刺激活性需要SH2D1A (J. Immunol. 177: 3170-3177 (2006))。它进一步促进了RORC向IL-17启动子的募集 (J. Biol. Chem. 287: 38168-38177 (2012))。与SLAMF1和CD84/SLAMF5联合, SLAMF6可能是体液免疫反应的负调节剂。在没有SH2D1A/SAP的情况下, SLAMF6可以向CD4⁺T细胞和NKT细胞传递负信号。它还通过抑制T细胞:B细胞粘附来负调节生发中心形成; 该功能可能暗示在没有SH2D1A/SAP的情况下, 通过ITSM的增加的与PTPN6/SHP-1的关联。

[0005] W02008/027739公开了抗NTB-A抗体和包含此类抗体的药物组合物。还描述了使用此类抗体结合NTB-A和治疗疾病的方法, 所述疾病例如血液恶性肿瘤, 其以NTB-A表达为特征。

[0006] W02014/100740和W02017/004330公开了与NTB-A特异性结合的抗体, 包括抗体药物偶联物, 以及使用这些抗体检测或调节表达NTB-A的细胞的活性的方法。还公开了治疗与表达NTB-A的细胞相关联的疾病的方法, 例如多发性骨髓瘤, 非霍奇金淋巴瘤和急性髓性白血病。

[0007] W02015/104711描述了用于体外和体内的改进的T细胞调节以及用于治疗癌症和其它病理的组合物和方法。更具体地, 本发明的实施方式涉及可溶性NTB-A多肽或其激动剂用于治疗癌症患者, 用于预防和治疗易感患者的血细胞减少症以及用于改进的细胞组合物的离体制备的用途。

发明内容

[0008] 本发明的方面包括针对SLAMF6的特异性抗体, 针对SLAMF6和肿瘤相关抗原的双特异性抗体, 编码本发明的此类抗体的核酸, 包含编码本发明的抗体的此类核酸的宿主细胞,

制备本发明抗体的方法,和用于治疗疾病例如人类癌症的方法,所述疾病包括但不限于小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌)皮肤癌包括黑素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌和胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,GIST,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0009] 本文描述了能与SLAMF6(SEQ ID NO:11)结合的抗体。优选地,所述抗体结合SLAMF6的胞外域(SEQ ID NO:12)。本发明的方面包括抗体或其抗原结合片段,其结合至由本文所述的抗体识别的SLAMF6蛋白上的表位,或其与本文所述的抗体交叉竞争结合,并且其优选保留本文所述抗体对于人SLAMF6的结合亲和性的至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约91%,至少约92%,至少约93%,至少约94%,至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%或至少约99%。在一些实施方式中,抗体是分离的抗体。

[0010] 本发明的方面包括一种抗体或其抗原结合片段,其能结合至SLAMF6,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:含有SEQ ID NO:5的序列的CDR-H1序列;含有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:15的序列的CDR-H2序列;和含有SEQ ID NO:7的序列的CDR-H3序列。在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段还包含轻链可变区,所述轻链可变区包含选自下组的至少一个CDR序列:含有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:16之任一序列的CDR-L1;含有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:17之任一序列的CDR-L2;和含有SEQ ID NO:10的序列的CDR-L3。

[0011] 在一些实施方式中,结合至SLAMF6的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其包含表1所示的重链和轻链CDR的8种组合之一。

[0012] 表1

	重链可变区 CDR			轻链可变区 CDR			
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	
[0013]	1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
	2	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
	3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:10
	4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:10
	5	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
	6	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
	7	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:10
	8	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:10

[0014] 在一些优选实施方式中,能结合SLAMF6的所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含:含有SEQ ID NO:5的CDR-H1;含有SEQ ID NO:6的CDR-H2;和含有SEQ ID NO:7的CDR-H3;和轻链可变区,所述轻链可变区包含:含有SEQ ID NO:8的CDR-L1;含有SEQ ID NO:9的CDR-L2;和含有SEQ ID NO:10的CDR-L3。

[0015] 在另一些优选实施方式中,能结合SLAMF6的所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含:含有SEQ ID NO:5的CDR-H1;含有SEQ ID NO:15的CDR-H2;和含有SEQ ID NO:7的CDR-H3;和轻链可变区,所述轻链可变区包含:含有SEQ ID NO:16的CDR-L1;含有SEQ ID NO:17的CDR-L2;和含有SEQ ID NO:10的CDR-L3。

[0016] 在另一方面,与本文所述的亲本(parent)抗体相比,本发明的抗体或其抗原结合片段包含变体CDR。因此,本发明提供了变体抗体或其抗原结合片段,其包含亲本抗体的变体可变区,其中亲本抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,该重链可变区包含:含有SEQ ID NO:5的序列的CDR-H1序列;含有SEQ ID NO:15的序列的CDR-H2序列;和含有SEQ ID NO:7的序列的CDR-H3序列;和轻链可变区,所述轻链可变区包含:含有SEQ ID NO:16的序列的CDR-L1;含有SEQ ID NO:17的序列的CDR-L2;和含有SEQ ID NO:10的序列的CDR-L3,并且其中,在一个实施方式中,所述变体抗体或其抗原结合片段在所述CDR-H1,CDR-H2,CDR-H3,CDR-L1,CDR-L2和CDR-L3组的任何一个或多个中具有1,2,3,4,5或6个氨基酸取代、添加和/

或缺失;或在所述CDR-H1,CDR-H2,CDR-H3,CDR-L1,CDR-L2和CDR-L3组的任何一个或多个中总共具有1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个氨基酸取代、添加和/或缺失;其中1至5或1至4或1至3个取代、添加或缺失具有特定用途,并且其中所述抗体或其抗原结合片段保留对SLAMF6的结合特异性。优选地,变异是取代,优选地,取代是保守取代,或将可变区中的氨基酸回复为人种系的相应氨基酸的取代。在其它实施方式中,本发明的变体抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:5的序列的CDR-H1序列;含有SEQ ID NO:15的序列的CDR-H2序列;和含有SEQ ID NO:7的序列的CDR-H3序列;和轻链可变区,所述轻链可变区包含:含有SEQ ID NO:16的序列的CDR-L1;含有SEQ ID NO:17的序列的CDR-L2;和含有SEQ ID NO:10的序列的CDR-L3,其中所述CDR序列中的一个或多个被改变,以使其与上述相应的亲本CDR序列约70%,75%,80%,85%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%相同。

[0017] 在一些实施方式中,提供了一种抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:13中所述的重链可变区,或与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:13约80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%相同的序列,和/或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:14中所述的轻链可变区,或与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:14约80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%相同的序列。在其它实施方式中,提供了一种抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区,所述重链可变区与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:13相比包含1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11或12个氨基酸取代、添加和/或缺失,和/或轻链可变区,所述轻链可变区与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:14相比包含1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11或12个氨基酸取代、添加和/或缺失。优选地,变体包含取代,更优选保守取代。

[0018] 进一步显见的是,氨基酸取代、添加和/或缺失可以在框架区内和/或在CDR内。

[0019] 在一个实施方式中,提供了一种抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区,其中所述重链可变区含有SEQ ID NO:1的序列,和轻链可变区,所述轻链可变区含有SEQ ID NO:2的序列。

[0020] 在一个实施方式中,提供了一种抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区,其中所述重链可变区含有SEQ ID NO:13的序列,和轻链可变区,所述轻链可变区含有SEQ ID NO:14的序列。

[0021] 在一个实施方式中,提供了一种全长抗体,其包含含有SEQ ID NO:18的重链序列和含有SEQ ID NO:19的轻链序列。

[0022] 在本发明的另一方面,提供了能特异性结合至SLAMF6的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段含有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:13的3个重链CDR,和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:14的3个轻链CDR,其中所述CDR由Kabat或Chothia编号系统定义。优选地,能特异性结合至SLAMF6的所述抗体或其抗原结合片段包含由Kabat或Chothia编号系统定义的SEQ ID NO:13的3个重链CDR和SEQ ID NO:14的3个轻链CDR。

[0023] SEQ ID NO:13-19是基于SEQ ID NO:1和2的序列的人源化抗体序列。本领域技术人员能容易地理解,SEQ ID NO:18-19是包括产生全长功能性抗体所需的非可变区区域(例如,恒定区和Fc区)的全长重链和轻链序列。本领域技术人员将理解,这些序列可通过如下方式人源化:用人种系序列的氨基酸替换产生所述抗体的生物体的可变区的氨基酸,所述替换以使这些抗体在给予人类对象时的免疫原性作用最小化的方式进行。大多数氨基酸取

代发生在框架区,然而CDR的存在于非关键位置的许多氨基酸也可以被取代;这种取代优选是性质保守的或将特定位置的氨基酸回复为相应人种系中存在的氨基酸。在目前的情况下,来自被取代的CDR的氨基酸已使用结构模型进行鉴定,以区分CDR区域中的互补位残基(paratope facing residue)和非互补位残基。与简单的CDR移植相比,这允许抗体在更高程度上人源化。

[0024] 在本发明中,与SEQ ID NO:1的CDR2 (SEQ ID NO:6) 相比,SEQ ID NO:13在CDR2 (SEQ ID NO:15) 中包含2个氨基酸取代。具体而言,在SEQ ID NO:6的第16位有K-Q取代;且在SEQ ID NO:6的第17位有D-G取代。

[0025] 在本发明中,与SEQ ID NO:2的CDR1 (SEQ ID NO:8) 相比,SEQ ID NO:14在CDR1 (SEQ ID NO:16) 中包含3个氨基酸取代。具体而言,在SEQ ID NO:8的第1位有S-Q取代;SEQ ID NO:8的第4位有S-Q取代;且在SEQ ID NO:8的第5位有S-D取代。与SEQ ID NO:2的CDR2 (SEQ ID NO:9) 相比,SEQ ID NO:14在CDR2 (SEQ ID NO:17) 中还包含1个氨基酸取代。具体而言,在SEQ ID NO:9的第7位有S-T取代。

[0026] 本领域技术人员将理解,当与亲本抗体相比时,这些人源化序列不代表不同的、替代性的抗体,而是涉及具有相同特征的同抗体,其仅仅被改变以更紧密地对应于人类种系(采用结构建模以最小化免疫原性)。

[0027] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段具有5nM,4nM,3nM,2nM,1nM或更小的结合亲和性(K_D)。

[0028] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段是单克隆抗体。在一些实施方式中,抗体是嵌合,人源化或人抗体。在一些实施方式中,重链可变区包含框架序列。在一些实施方式中,框架序列的至少部分包含人共有框架序列。在一些实施方式中,轻链可变区包含框架序列。在一些实施方式中,框架序列的至少部分包含人共有框架序列。

[0029] 还采用了替代策略来减轻抗体效应子功能,包括抗体下铰链中的残基(例如L234A和L235A (LALA))的取代。这些残基形成CH2结构域上Fc- γ 受体结合位点的部分,并且这些残基在具有更多或更少效应子功能的抗体同种型之间的交换确定了它们在ADCC中的重要性。虽然这些位点的丙氨酸取代可有效减少人和鼠抗体中的ADCC,但这些取代在降低CDC活性方面作用较差(Lo M等,J Biol Chem.2017年3月3日;292(9):3900-3908)。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段是经工程改造以降低与FC γ 受体的结合的Fc变体,且它导致降低的效应子功能和ADCC活性。

[0030] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段是Fc沉默的经工程改造的IgG1抗体或抗原结合片段,其与一种或多种Fc具有减少的结合或无结合。在另一个实施方式中,抗体是IgG4抗体。

[0031] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段是介导T细胞细胞毒性和/或NK细胞细胞毒性的双特异性抗体或抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段能够诱导和/或增强免疫细胞的活化。在一个实施方式中,免疫细胞优选地是T细胞。在另一个实施方式中,免疫细胞优选地是NK细胞。本领域技术人员将理解,术语诱导和/或增强可指诱导和/或增强免疫细胞的细胞因子释放和/或诱导和/或增强所述免疫细胞的增殖和/或诱导和/或增强细胞杀伤活性。本领域技术人员显见的是,本文中使用的术语诱导或诱导的是指引起免疫细胞的活化,或将免疫细胞的活化增加至高于在无抗体或抗原结合片段存在时所见

的活化水平。在本文中使用的术语增强是指增加已经活化的免疫细胞的活化水平。

[0032] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段是双特异性或多特异性抗体或抗原结合片段,其能结合至SLAMF6蛋白(例如SEQ ID NO:11)并结合至一个或多个其它结合靶标,优选地所述其它结合靶标是一种或多种肿瘤抗原。在另一个实施方式中,一个或多个其它结合靶标是免疫调节分子。在一个实施方式中,其它结合靶标是PD-L1。在一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段是二价的。在另一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段是四价的。在另一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段是三价的。

[0033] 在一些实施方式中,抗原结合片段选自:Fab,Fab',F(ab)₂,F(ab')₂,Fv,FVTCR,scFv,dAb和单域抗体。

[0034] 在本发明的另一方面,提供了编码本发明抗体重链和/或本发明抗体轻链的一种或多种核酸。应理解,本发明的抗体的重链和轻链可处于单个核酸分子上,或由两个单独的核酸分子一起编码。

[0035] 在另一方面,提供了包含一种或多种本发明核酸的载体。

[0036] 在本发明的另一方面,提供了包含编码本发明抗体的重链和/或轻链或两者的一种或多种核酸的宿主细胞。在一些实施方式中,所述宿主细胞在表达所述核酸的条件下生长。在其它实施方式中,提供了一种回收本发明的抗体的方法。

[0037] 本发明的方面包括制备抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括:在其中所述抗体或抗原结合片段在宿主细胞中表达的条件下培养所述宿主细胞,和,任选地分离所述抗体或抗原结合片段。

[0038] 本发明的方面包括包含如本文所述的抗体或抗原结合片段和药学上可接受的运载体的药物组合物。

[0039] 在一些实施方式中,药物组合物或药物还包含有效量的第二治疗剂。

[0040] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗病症的方法,所述方法包括:向有需要的患者给予能结合至SLAMF6(SEQ ID NO:11)的本发明的抗体或抗原结合片段。在一个实施方式中,所述病症是癌症。

[0041] 在另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的对象给予有效量的本发明的抗体或抗原结合片段。

[0042] 在一个实施方式中,抗体或抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含:含有SEQ ID NO:5的CDR-H1;含有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:15的CDR-H2,和含有SEQ ID NO:7的CDR-H3,和轻链可变区,所述轻链可变区包含:含有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:16的CDR-L1,含有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:17的CDR-L2和含有SEQ ID NO:10的CDR-L3。

[0043] 优选地,重链可变区包含:含有SEQ ID NO:5的CDR-H1,含有SEQ ID NO:15的CDR-H2和含有SEQ ID NO:7的CDR-3。

[0044] 优选地,轻链可变区包含:含有SEQ ID NO:16的CDR-L1,含有SEQ ID NO:17的CDR-L2和含有SEQ ID NO:10的CDR-L3。

[0045] 在一些实施方式中,提供了一种治疗癌症的方法,其中向有需要的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段,并且其中所述本发明的抗体或抗原结合片段能诱导和/或增强免疫应答,例如,细胞毒性T细胞反应和/或NK细胞反应。

[0046] 在另一个实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含:能结合至SLAMF6(SEQ ID

NO:11) 和肿瘤特异性抗原的双特异性或多特异性抗体或其抗原结合片段。

[0047] 在一些实施方式中,癌症选自小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结肠直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,胃肠道间质瘤,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0048] 根据本发明的另一方面,提供了用于预防或治疗的本发明的抗体或抗原结合片段。

[0049] 优选地,抗体或抗原结合片段用于预防或治疗癌症。

[0050] 根据本发明的另一方面,提供了根据本发明的抗体或抗原结合片段在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0051] 在一些实施方式中,根据前述方面的癌症选自小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结肠直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,胃肠道间质瘤,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0052] 附图简要说明

[0053] 图1a显示亲本鼠1B3抗体重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0054] 图1b显示亲本鼠1B3抗体轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0055] 图2a显示人源化抗体Hu_1B3重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)。

[0056] 图2b显示人源化抗体Hu_1B3轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。

[0057] 图3a显示1B3亲本鼠抗体序列的重链可变区与人源化重链可变区1B3序列的序列比对。

[0058] 图3b显示1B3亲本鼠抗体序列的轻链可变区与人源化轻链可变区Hu_1B3序列的序列比对。

[0059] 图4显示抗体1B3与表达1B3的Raji细胞的特异性剂量相关结合。

[0060] 图5显示抗体Hu_1B3在T细胞活化后介导IFN γ 产生的能力与另一个临床阶段的SLAMF6抗体相比有所增强。

[0061] 图6显示抗体1B3可诱导从原发性NSCLC肿瘤样品中分离的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)在离体试验中产生干扰素 γ 。

[0062] 图7显示抗体1B3可诱导从原发性乳腺癌样品分离的TIL,以在离体试验中产生干扰素 γ 。该试验表明,与派姆单抗相比,抗体1B3具有增强的活性。

[0063] 图8显示抗体1B3可诱导从原发性结肠直肠癌样品分离的TIL,以在离体试验中产生干扰素 γ 。该试验表明,与派姆单抗相比,抗体1B3具有增强的活性。

[0064] 图9显示使用抗体Hu_1B3活化存在于分离的T细胞上的SLAMF6诱导CD8⁺T细胞增殖。

[0065] 图10是MLR试验并且显示抗体Hu_1B3可诱导DC介导的T细胞活化,如通过IFN γ 释放的增加所突出显示的那样。

[0066] 图11显示抗SLAMF6抗体Hu_1B3可以剂量依赖性方式诱导活化的T细胞产生颗粒酶

B。

[0067] 图12显示抗体Hu_1B3以剂量依赖性方式上调CD8+T细胞上的穿孔素表达。

[0068] 图13显示在人SLAMF6ECD-mIgG2aFc融合蛋白的存在下,Hu_1B3抗体被阻断与PBMC表面上的受体结合。

[0069] 图14显示人源化抗体Hu_1B3内化到表达SLAMF6的细胞中显著少于西雅图遗传学公司(Seattle Genetics)生产的抗SLAMF6抗体。

[0070] 图15和16显示当与抗her2抗CD3双特异性抗体一起使用时,Hu_1B3的添加增强了淋巴细胞对SKBR-3细胞的细胞毒性。

[0071] 图17显示当与抗her2抗CD3双特异性抗体一起使用时,Hu_1B3的添加增强了淋巴细胞对HCT116细胞的细胞毒性。

[0072] 图18显示当与抗her2抗CD3双特异性抗体一起使用时,Hu_1B3的添加增强了淋巴细胞对MDA-MB-231细胞的细胞毒性。

[0073] 图19显示,在用各种抗体活化淋巴细胞96小时后,抗体HU_1B3导致比Urelumab(抗CD137)或同种型显著更多的SKBR-3细胞死亡。

[0074] 图20显示当与固定浓度的抗Her2/抗CD3双特异性抗体一起使用时,添加Hu_1B3以剂量依赖性方式增强淋巴细胞对SKBR-3细胞的细胞毒性。

[0075] 图21a和21b显示在不存在使能双特异性抗体(enabling bispecific antibody)的情况下添加Hu_1B3也增强了淋巴细胞对SKBR-3细胞的细胞毒性。

具体实施方式

[0076] 本发明的方面包括针对SLAMF6的抗体,编码此类抗体的核酸,包含编码本发明抗体的此类核酸的宿主细胞,制备抗SLAMF6抗体的方法和治疗疾病的方法,例如SLAMF6介导的疾病,例如人类癌症,包括但不限于小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌)皮肤癌包括黑素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌和胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,GIST,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0077] 注意到,本文和所附权利要求书所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数含义,除非另有明确说明。还应注意,权利要求书可撰写成排除任何任选要素。因此,该说明旨在用作与权利要求要素的叙述或使用“否定”限制有关的“单独”,“仅”等专用术语的先行基础。

[0078] 正如本领域技术人员在阅读本公开后所能显见的,本文描述和说明的每个单独的方面具有离散的组成和特征部,这些组成和特征部可方便地分离或与任何其余多个方面的特征部结合而不偏离本发明的范围和精神。任意提及的方法可以所提及的事件顺序进行或以逻辑上可行的任意其它序列进行。

[0079] 定义

[0080] 出于解释本说明书目的,将应用以下定义,并在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。

[0081] 除非另有说明,本文所用术语“SLAMF6”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然

SLAMF6蛋白,包括哺乳动物,例如灵长类动物(例如,人,灵长类动物和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠))。SLAMF6蛋白也可称为SLAMF6样蛋白。人SLAMF6的氨基酸序列在本文中提供在SEQ ID NO:11中。

[0082] 术语“SLAMF6”包括“全长”未加工的SLAMF6以及细胞中加工产生的任何形式的SLAMF6。该术语还包括SLAMF6的天然存在的变体,例如剪接变体,等位基因变体和同种型。该术语具体包括SLAMF6多肽的天然存在的截短或分泌形式(例如,胞外域序列)。本文所述的SLAMF6多肽可分离自各种来源,如分离自人组织类型或其他来源,或通过重组或合成方法制备。“天然序列SLAMF6多肽”包括与相应的源自自然界的SLAMF6多肽具有相同氨基酸序列的多肽。此类天然序列SLAMF6多肽可从自然界分离或可通过重组或合成方式产生。如本文所用,术语“SLAMF6表位”是指由包含至少一个或多个本文所述CDR序列的抗体结合的表位,和/或如实施例中所示的抗SLAMF6抗体的结合谱所例示的表位。

[0083] 术语“抗体”以最广泛的含义使用,具体涵盖例如单一抗SLAMF6单克隆抗体(包括激动剂,拮抗剂,中和抗体,全长或完整单克隆抗体),具有多表位特异性的抗SLAMF6抗体组合物,由至少两种完整抗体,单链抗SLAMF6抗体和抗SLAMF6抗体的抗原结合片段(包括Fab, Fab', F(ab')₂和Fv和FV-TCR片段,双抗体,单域抗体(sdAb),只要它们表现出所需的生物学或免疫学活性即可)形成的多克隆抗体,多价抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们表现出所需的生物活性即可)。术语“免疫球蛋白(Ig)”与本文中的术语“抗体”可互换使用。抗体可以是嵌合的,人的,人源化的和/或亲和性成熟的。本领域普通技术人员应理解,在一些实施方式中,最小形式的抗体包含如本文定义的一组6个CDR;它们包括但不限于传统抗体(包括单克隆和多克隆抗体),人源化,人和/或嵌合抗体,抗体片段,工程改造抗体(例如,具有如下所述的氨基酸修饰),多特异性抗体(包括双特异性抗体),以及本领域已知和本文讨论的其它类似物。

[0084] 应理解,在其它实施方式中,本文使用的术语抗体是指不包含6个CDR的结构;包括但不限于Nanobody®, Unibody®和scFv片段。

[0085] 术语“抗SLAMF6抗体”,“SLAMF6抗体”或“(能)结合至SLAMF6的抗体”是指能够以足够的亲和性结合SLAMF6,从而使得该抗体在靶向SLAMF6中可用作诊断和/或治疗剂。在某些实施方式中,抗SLAMF6抗体结合至在来自不同物种的SLAMF6中保守的SLAMF6表位。

[0086] “分离的抗体”是一种已被鉴定,分离和/或从其环境组分中回收的抗体。其环境的污染成分是会干扰抗体治疗用途的物质,可能包括酶,激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。

[0087] 就抗体与靶分子的结合而言,针对特定多肽或特定多肽靶标上的表位,术语“特异性结合”、“特异性结合于”或对“……具有特异性”是指相对于非特异性相互作用而言具有可检测到的区别的結合。例如,特异性结合可通过测定某分子的结合并与对照分子的结合进行比较来测量,对照分子通常是结构上相似但没有结合活性的分子。

[0088] 术语“拮抗剂”以最广泛的含义使用,包括部分或完全阻断,抑制或中和天然SLAMF6多肽的生物活性的任何分子。合适的拮抗剂分子具体包括天然SLAMF6多肽,肽,反义寡核苷酸,有机小分子等的拮抗剂抗体或抗体片段,片段或氨基酸序列变体。鉴定SLAMF6多肽的拮抗剂的方法可以包括将SLAMF6多肽与候选拮抗剂分子接触,和,测量通常与SLAMF6多肽相关的一种或多种生物活性的可检测变化。

[0089] 术语“激动剂”以最广泛的意义使用,并且包括增强天然SLAMF6多肽的生物活性的

任何分子。合适的激动剂分子具体包括SLAMF6配体多肽,肽,反义寡核苷酸,有机小分子等的激动剂抗体或抗体片段,片段或氨基酸序列变体。鉴定SLAMF6多肽激动剂的方法可以包括:将SLAMF6多肽与候选激动剂分子接触,和,测量通常与SLAMF6多肽相关的一种或多种生物活性的可检测变化。

[0090] 如本文所用,“肿瘤”是指所有瘤细胞(neoplastic cell)生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌性细胞和组织。

[0091] 本文所用的术语“预测的”和“预后的”也可以互换,意思是预测或预后的方法允许实践该方法的人选择被认为(通常在治疗之前,但不一定)更可能对抗癌药物(包括抗SLAMF6抗体)的治疗产生反应的患者。

[0092] SLAMF6蛋白

[0093] 根据UNIPROT,SLAMF6是免疫球蛋白超家族和CD2亚家族的单程I型膜蛋白。所述蛋白质由SEQ ID NO:11的氨基酸22-226之间的细胞外结构域,氨基酸227-247之间的一个跨膜区和氨基酸248-331之间的一个胞质区组成。

[0094] 在一些实施方式中,本发明的抗体能结合至人SLAMF6。如本文所用“人SLAMF6”或“人SLAMF6蛋白”是指如本文所定义的具有SEQ ID NO:11的蛋白质。

[0095] 在某些情况下,根据本发明的实施方式的抗体可以与来自非人物种的SLAMF6蛋白交叉反应。例如,为了促进临床前和毒理学测试,本发明的抗体可以与鼠或灵长类SLAMF6蛋白交叉反应。或者,在某些实施方式中,抗体可能对人SLAMF6蛋白具有特异性并且可能不显示物种或其它类型的非人交叉反应性。

[0096] 抗体

[0097] 本发明的方面包括抗SLAMF6抗体,一般是治疗性和/或诊断性抗体,如本文所述。可用于本发明方法的抗体可以采用如本文所述的多种形式中的任一种,包括传统抗体以及抗体衍生物,抗原结合片段和模拟物,如本文进一步所述。在一些实施方式中,抗体具有选自如本文定义的一组6个CDR(包括如本文所述的少量氨基酸变化)的一个或多个CDR。如上所述,本文使用的术语“抗体”是指多种结构。

[0098] 在一些实施方式中,本发明使用IgG同种型。在一个实施方式中,使用Fc沉默的IgG1同种型抗体。在另一个实施方式中,使用了IgG4同种型抗体。

[0099] 抗体各链的氨基末端部分包含约100-110或更多个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。在可变区,重链和轻链的各V域聚集三个环,形成一个抗原结合位点。每个环被称为互补决定区(以下简称“CDR”),其中氨基酸序列的变异最为显著。“可变”是指可变区的某些片段在抗体之间的序列差异很大。可变区内的可变性不是均匀分布的。相反,V区由以下组成:称之为框架区(FR)的约15-30个氨基酸的较少可变的区段,以及分隔这些FR的称之为“高变区”的极具可变性的、长度各为9-15个氨基酸或更长的较短区域。

[0100] 每个VH和VL由三个高变区(“互补决定区”,“CDR”)和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0101] 高变区通常包括来自轻链可变区中的约氨基酸残基24-34(CDR-L1;“L”表示轻链),50-56(CDR-L2)和89-97(CDR-L3),和重链可变区中的约31-35B(CDR-H1;“H”表示重链),50-65(CDR-H2)和95-102(CDR-H3)的氨基酸残基;Kabat等,免疫学热门蛋白质序列(SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST),第5版,公共健康服务(Public

Health Service), 国立卫生研究院 (National Institutes of Health), 马里兰州贝塞斯达 (1991) 和/或形成高变环的那些残基 (例如, 轻链可变区中的残基26-32 (CDR-L1)、50-52 (CDR-L2) 和91-96 (CDR-L3) 和重链可变区中的残基26-32 (CDR-H1)、53-55 (CDR-H2) 和96-101 (CDR-H3); Chothia和Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917。本发明的特定CDR如下所述。

[0102] 在本说明书中, Kabat编号系统通常用于指可变结构域中的残基 (约为轻链可变区的残基1-107和重链可变区的残基1-113) (例如, Kabat等, 同上 (1991))。

[0103] CDR有助于抗原结合位点的形成, 或更具体地, 抗体的表位结合位点的形成。单一抗原可能具有多于一个表位。

[0104] 在免疫球蛋白的IgG亚类中, 重链中有几个免疫球蛋白结构域。在本文中, “免疫球蛋白 (Ig) 结构域” 是指具有不同三级结构的免疫球蛋白区域。本发明感兴趣的是重链结构域, 包括恒定重 (CH) 结构域和铰链结构域。在IgG抗体的情形中, IgG同种型各有三个CH区。

[0105] 重链的另一类Ig结构域是铰链区。“铰链”或“铰链区”或“抗体铰链区”或“免疫球蛋白铰链区”在本文中是指包含抗体的第一和第二恒定域之间的氨基酸的柔性多肽。

[0106] 本发明特别感兴趣的是Fc区。如本文所用, “Fc”或“Fc区”或“Fc结构域”是指包含抗体恒定区的多肽, 不包括第一恒定区免疫球蛋白结构域, 并且在一些情况下, 部分铰链。因此, Fc是指IgA, IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域, IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域, 以及这些结构域N端的柔性铰链。对于IgA和IgM, Fc可能包含J链。对于IgG, Fc结构域包含免疫球蛋白结构域C γ 2和C γ 3 (C γ 2和C γ 3) 以及C γ 1 (C γ 1) 和C γ 2 (C γ 2) 之间的下铰链区。尽管Fc区的边界可能会有所不同, 但人IgG重链Fc区通常被定义为在其羧基末端包括残基C226或P230, 其中编号是根据Kabat中的EU索引。在一些实施方式中, 对Fc区进行氨基酸修饰, 例如以改变与一种或多种Fc γ R受体或与FcRn受体的结合。

[0107] 在一些实施方式中, 抗体是全长的。本文中的“全长抗体”是指构成抗体的天然生物学形式的结构, 包括可变区和恒定区, 任选地包括本文概述的一种或多种修饰。

[0108] 或者, 抗体可以是多种结构, 包括但不限于抗原结合片段, 单克隆抗体, 双特异性抗体, 微型抗体, 域抗体, 合成抗体 (本文有时称为“抗体模拟物”), 嵌合抗体, 人源化抗体, 抗体融合物 (有时称为“抗体偶联物”) 和各自的抗原结合片段。依赖于使用一组CDR的结构包含在“抗体”的定义中。

[0109] 在一个实施方式中, 抗体是抗原结合片段。特定的抗原结合抗体片段包括但不限于, (i) 由VL, VH, CL和CH1结构域组成的Fab片段, (ii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段, (iii) 由单个抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段; (iv) dAb片段 (Ward等, 1989, *Nature* 341: 544-546, 通过引用其全文纳入本文), 其由单个可变区组成, (v) 分离的CDR区, (vi) F(ab')₂片段, 包含两个连接的Fab片段的二价片段, (vii) 单链Fv分子 (scFv), 其中VH结构域和VL结构域通过肽接头连接, 所述肽接头允许两个结构域联合以形成抗原结合位点 (Bird等, 1988, *Science* 242:423-426, Huston等, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883, 通过引用其全文纳入本文), (viii) 双特异性单链Fv (WO 03/11161, 通过引用纳入本文) 和 (ix) “双抗体”或“三抗体”, 通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (Tomlinson等, 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO 94/13804; Holliger等, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448, 均通过引用其全文纳入本文)。

[0110] 嵌合抗体和人源化抗体

[0111] 在一些实施方式中,抗体可以是来自不同物种的混合体,例如嵌合抗体和/或人源化抗体。即,在本发明中,CDR组可以与除本文序列具体描述的那些之外的构架区和恒定区一起使用。

[0112] 一般而言,“嵌合抗体”和“人源化抗体”均指合并了来自多个物种的区域的抗体。例如,“嵌合抗体”传统上包括来自小鼠(或大鼠,在某些情况下)的可变区和来自人的恒定区。“人源化抗体”通常是指已将可变结构域框架区替换为人抗体中存在的序列的非人抗体。通常,在人源化抗体中,除CDR之外的整个抗体由人源的多核苷酸编码,或者,除其CDR内区域以外与此类抗体相同。CDR,部分或全部由源自非人生物体的核酸编码,被移植到人抗体可变区的 β -折叠框架中以产生抗体,其特异性由移接的CDR决定。此类抗体的生产描述于,例如,WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen等, 1988, Science 239:1534-1536, 其全部通过引用纳入本文。在一个实施方式中,本发明的抗体可以是多特异性抗体,特别是双特异性抗体,有时也称为“双抗体”。这些是能结合至两种(或多种)不同抗原或同一抗原上的不同表位的抗体。双抗体可以本领域已知的多种方式制造(Holliger和Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, 均以引用方式纳入本文), 例如,化学制备或从杂交瘤制备。

[0113] 在一个实施方式中,抗体是微型抗体。微型抗体是最小化的抗体样蛋白,包含连接到CH3结构域的scFv。Hu等, 1996, Cancer Res. 56:3055-3061, 通过引用其全文方式纳入本文。在某些情况下,scFv可以接合到Fc区,并且可以包括一些或整个铰链区。应注意,尽管微型抗体没有完整的CDR组,但它仍包含在“抗体”的定义中。

[0114] 本发明的抗体通常是分离的或重组的。

[0115] 在一些实施方式中,本发明的抗体是重组蛋白,分离的蛋白质或基本上纯的蛋白质。“分离的”蛋白质不伴有至少一些在其自然状态下通常与之相关的材料,例如构成给定样品中总蛋白质重量的至少约5%或至少约50%的那些。应理解,根据不同情况,分离的蛋白质可以占总蛋白质含量的5至99.9重量%。例如,可以通过使用诱导型启动子或高表达启动子以显著更高的浓度制备蛋白质,从而制备浓度水平增加的蛋白质。在重组蛋白的情况下,该定义包括在本领域已知的多种生物体和/或宿主细胞中产生抗体,其中在抗体在所述生物体和/或宿主细胞中不是天然产生的。通常,分离的多肽将通过至少一个纯化步骤来制备。“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体。例如,特异性结合SLAMF6的分离的抗体基本上不含特异性结合除SLAMF6以外的其它抗原的抗体。

[0116] 具有不同特异性的分离的单克隆抗体可以组合成组分明确(well-defined)的组合物。因此,例如,本发明的抗体可以任选地和单独地包括或排除在制剂中,如下文进一步讨论。

[0117] 对特定抗原或表位的特异性结合可以通过例如以下特征显示:抗体对于某一抗原或表位的 K_D 是至少约 $10^{-4}M$,至少约 $10^{-5}M$,至少约 $10^{-6}M$,至少约 $10^{-7}M$,至少约 $10^{-8}M$,至少约 $10^{-9}M$,或者至少约 $10^{-10}M$,至少约 $10^{-11}M$,至少约 $10^{-12}M$,或更高,其中 K_D 指的是特定抗体-抗原相互作用的解离率。通常,特异性结合至抗原的抗体对于所述抗原或表位的 K_D 相对于对照分子低20倍,50倍,100倍,500倍,1000倍,5,000倍,10,000倍或更多倍。

[0118] 同样,对于特定抗原或表位的特异性结合可以例如通过如下方式显示:抗体对于

抗原或表位的 K_A 或 K_a 相对于对照对于该表位的情形大至少20倍,50倍,100倍,500倍,1000倍,5,000倍,10,000倍或更多倍,其中 K_A 或 K_a 指的是特定抗体-抗原相互作用的结合率。

[0119] 评估抗体对SLAMF6的结合能力的标准试验可在蛋白质或细胞水平上进行并且是本领域已知的,包括例如ELISA,Western印迹,RIA,Octet®, BIAcore® 试验和流式细胞术分析。合适的试验在实施例详细描述。抗体的结合动力学(例如结合亲和性)也可以通过本领域中已知的标准试验法,如通过Biacore®或Octet® 系统分析评估。

[0120] SLAMF6抗体

[0121] 本发明提供结合至SLAMF6多肽或其部分的SLAMF6抗体。SEQ ID NO:11中提供了SLAMF6氨基酸序列的示例。主题SLAMF6抗体可诱导或增强免疫细胞活化,例如T细胞活化和/或NK细胞活化,以增强肿瘤中的免疫反应。这些抗体在本文中被称为“抗SLAMF6”抗体,或者为了便于描述,被称为“SLAMF6抗体”。

[0122] 在一些实施方式中,主题SLAMF6抗体可在与T细胞接触时诱导和/或增强细胞因子释放或增殖,特别是在其表面表达SLAMF6的CD4+或CD8+T细胞。在这种情况下,细胞因子释放或T细胞增殖可以通过多种方式进行测量。在一个实施方式中,使用标准试验例如ELISA使本发明的SLAMF6抗体与活化的T细胞接触。在另一个实施方式中,主题SLAMF6抗体可以诱导和/或增强NK细胞活化和杀伤。

[0123] 在一个实施方式中,抗体是包含以下CDR的抗体;此外,如下所述,这些CDR序列还可以包含有限数量的如前所述的氨基酸变体:

[0124]

CDR	SEQ ID NO:
1B3_VH_CDR1	SEQ ID NO:5
1B3_VH_CDR2	SEQ ID NO:15
1B3_VH_CDR3	SEQ ID NO:7
1B3_VL_CDR1	SEQ ID NO:16
1B3_VL_CDR2	SEQ ID NO:17
1B3_VL_CDR3	SEQ ID NO:10

[0125] 在一些实施方式中,抗体包含在SEQ ID NO:5,15,7,16,17和10中提供的至少一个或多个CDR序列的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体包含与SEQ ID NO:5,15,7,16,17和10中提供的一个或多个CDR序列的氨基酸序列至少约75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%相同的氨基酸序列。

[0126] 本文还公开了包含本发明的CDR组的可变重链和轻链,以及全长重链和轻链(例如,也包含恒定区)。如本领域技术人员所理解的,本发明的CDR组可并入鼠、人源化或人恒定区(包括框架区)。本发明的方面包括与本文公开的重链可变区序列(SEQ ID NO:13)和轻链可变区序列(SEQ ID NO:14)至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%相同的重链可变区和轻链可变区。

[0127] 在一些实施方式中,本发明提供与本文所述的本发明的SLAMF6单克隆抗体结合至人SLAMF6上相同表位或与本文所述的本发明的SLAMF6单克隆抗体交叉竞争的抗体(即,具有与本文所述的本发明的单克隆抗体交叉竞争结合至SLAMF6蛋白的能力的抗体)。应理解,对于被认为是交叉竞争的抗体,它不一定完全阻断参考抗体的结合。在一些实施方式中,参

考抗体的结合减低至少约10,20,30,40,50,60,70,75,80,85,90,95,97,98或99%。

[0128] 抗体修饰

[0129] 本发明进一步提供变体抗体,有时称为“抗体衍生物”或“抗体类似物”。也即,可以对本发明的抗体进行许多修饰,包括但不限于CDR中的氨基酸修饰(亲和性成熟化),Fc区中的氨基酸修饰,糖基化变体和其它类型的共价修饰(例如,用于药物偶联物的连接等)。

[0130] “变体”是指由于至少一个氨基酸修饰而与亲本多肽的序列不同的多肽序列。在一些实施方式中,亲本多肽是在SEQ ID NO:1或2,13或14中列出的全长可变重链或轻链,或者是在SEQ ID NO:5至10,15,16或17中任一公开的CDR序列中的一或多个者。在一些实施方式中,氨基酸修饰可包括取代,插入和/或缺失,在许多情况下前者是优选的。在一些实施方式中,取代可以是保守取代。

[0131] 一般而言,变体可以包括任何数量的修饰,只要抗体的功能仍然存在即可,如本文所述。例如,抗体仍应与人SLAMF6特异性结合。类似地,例如,如果在Fc区内产生氨基酸变体,则变体抗体应保持抗体具体应用或适应症所需的受体结合功能。

[0132] 可以使主题抗体的“变体”在一个或多个所列CDR序列,一个或多个框架区或一个或多个恒定区(例如,在抗体的Fc区)中具有如本文所述的氨基酸变异。

[0133] 在一些实施方式中,与亲本序列相比,通常使用1,2,3,4,5,6,7,8,9或10个氨基酸修饰,因为通常目标是用最少数量的修饰改变功能。在一些实施方式中,存在1至5个(1,2,3,4或5)个修饰(例如,单个氨基酸取代,插入和/或缺失),其中在许多实施方式中还发现1-2,1-3和1-4个修饰是有用的。例如,在一些实施方式中,本发明抗体的一个或多个CDR序列可以单独包含一个或多个,例如1,2,3,4或5个氨基酸修饰,优选1-4,1-3,1或2个修饰。通常在—组CDR中采用不超过4,5,6,7,8,9或10个改变。

[0134] 应注意,氨基酸修饰的数量可能在功能域内:例如,可能期望在野生型或工程改造蛋白质的Fc区具有1-5个修饰,且例如在Fv区中具有1-5个修饰。变体多肽序列将优选地与亲本序列(例如,例如抗体1B3的可变区序列,恒定区序列和/或重链和轻链序列和/或CDR)具有至少约75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96,97%,98%或99%的同一性。

[0135] 本文中的“氨基酸取代”或“取代”是指用另一氨基酸取代亲本多肽序列中特定位置处的氨基酸。如本文所用,“氨基酸插入”或“插入”是指在亲本多肽序列的特定位置添加氨基酸。如本文所用,“氨基酸缺失”或“缺失”是指去除亲本多肽序列中特定位置处的氨基酸。

[0136] 如本文所用,“亲本多肽”,“亲本蛋白质”,“前体多肽”或“前体蛋白质”是指随后被修饰以产生变体的未修饰多肽。一般而言,本文所用的亲本多肽可指1B3多肽,例如1B3V_H或V_L链或CDR序列。因此,本文所用的“亲本抗体”是指经修饰以产生变体抗体的抗体。

[0137] “野生型”或“WT”或“天然”在本文中是指在自然界中存在的氨基酸序列或核苷酸序列,包括等位基因变异。WT蛋白,多肽,抗体,免疫球蛋白,IgG等具有未经有意修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0138] “变体Fc区”在本文中是指由于至少一个氨基酸修饰而与野生型Fc序列的Fc序列不同的Fc序列。Fc变体可以指Fc多肽本身,包含Fc变体多肽的组合物或氨基酸序列。

[0139] 在一些实施方式中,本发明的抗SLAMF6抗体由变体Fc结构域构成。正如本领域已

知的,抗体的Fc区与许多Fc受体和配体相互作用,提供一系列重要的功能能力,称为效应子功能。可以在一个或多个位置进行合适的修饰,特别是减低或沉默与Fc受体结合的特定氨基酸取代。

[0140] 除了上文概述的修饰之外,还可以进行其它修饰。例如,可以通过引入连接VH和VL结构域的二硫键来稳定分子(Reiter等,1996,Nature Biotech.14:1239-1245,通过引用全文方式纳入本文)。

[0141] 此外,半胱氨酸的修饰在抗体-药物偶联物(ADC)应用中特别有用,下文将进一步描述。在一些实施方式中,可以将抗体的恒定区工程改造成含有一种或多种特别具有“巯基反应性”的半胱氨酸,从而允许药物部分的更特异性和受控定位。参见例如美国专利号7,521,541,其通过引用全文方式纳入本文。

[0142] 此外,可以对抗体进行多种共价修饰,如下所述。

[0143] 抗体的共价修饰包括在本发明的范围内,并且通常但不总是在翻译后进行。例如,通过使抗体的特定氨基酸残基与能够与选择的侧链或N-或C-末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体的几种类型的共价修饰引入分子中。

[0144] 此外,如本领域技术人员所理解的,标记物(包括荧光的,酶促的,磁性的,放射性的等)都可以添加到抗体(以及本发明的其它组合物)中。

[0145] 双特异性分子

[0146] 在另一方面,本发明包括包含本发明的抗SLAMF6抗体或其片段的双特异性和多特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合部分可以衍生化或连接至另一功能分子,例如另一肽或蛋白质(例如受体的另一抗体或配体)以产生结合两种不同结合位点或靶分子的双特异性分子。在一些实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合部分可以衍生化或连接至至少两个功能分子,例如其它肽或蛋白质(例如受体的其它抗体或配体)以产生与至少三个不同的结合位点或靶分子结合的多特异性分子。为了产生本发明的双特异性或多特异性分子,本发明的抗体可以功能性连接(例如,通过化学偶联,遗传融合,非共价联合或其它方式)至一个或多个其它结合分子,例如另一抗体,抗体片段,肽或结合模拟物,从而产生双特异性或多特异性分子。

[0147] 因此,本发明包括包含针对第一靶标表位(即SLAMF6)的至少一个第一结合域和针对第二靶标表位的第二结合域的双特异性分子。第二靶标表位可以与由第一结合特异性结合的靶标表位存在于同一靶蛋白上;或者第二靶标表位可以与由第一结合特异性结合的靶标表位存在于不同的靶蛋白上。第二靶标表位可以与第一靶标表位(即SLAMF6)存在于同一细胞上;或者第二靶标表位可以存在于不由展示第一靶标表位的细胞展示的靶标上。如本文所用,术语“结合特异性”是指包含至少一个抗体可变结构域的部分。

[0148] 在本发明的另一个实施方式中,第二靶标表位存在于肿瘤细胞上。因此,本发明的方面包括能够结合至表达SLAMF6的效应细胞(例如表达SLAMF6的细胞毒性T细胞)和表达第二靶标表位的肿瘤细胞的双特异性分子。

[0149] 在一个实施方式中,本发明的双特异性抗体可具有总共两个或三个抗体可变结构域,其中双特异性抗体的第一部分能够通过位于人免疫效应细胞上的效应物抗原特异性结合来募集人免疫效应细胞的活性,其中效应物抗原为SLAMF6,所述第一部分由至少一个抗体可变结构域组成,并且,双特异性抗体的第二部分能够特异性结合至除效应物抗原以

外的靶抗原,所述靶抗原位于除所述人免疫效应细胞以外的靶细胞上,并且所述第二部分包含至少一个抗体可变结构域。

[0150] 在结合蛋白为多特异性的本发明的一个实施方式中,除了抗肿瘤结合特异性和抗SLAMF6结合特异性之外,分子还可以包括第三结合特异性。在一个实施方式中,第三结合特异性是抗增强因子(EF)部分,例如,与细胞毒活性涉及的表面蛋白结合从而增加针对靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是抗体,功能性抗体片段或与给定分子(例如抗原或受体)结合的配体,由此导致针对靶细胞抗原的结合决定簇的作用增强。“抗增强因子部分”可以结合靶细胞抗原。或者,抗增强因子部分可以结合与第一和第二结合特异性结合的实体不同的实体。例如,抗增强因子部分可以结合细胞毒性T细胞(例如,通过CD2,CD3,CD8,CD28,CD4,CD40,ICAM-1或导致针对靶细胞的免疫反应增强的其它免疫细胞)。

[0151] 在一个实施方式中,本发明的双特异性蛋白包含至少一种抗体或其抗原结合片段作为结合特异性,包括例如Fab,Fab',F(ab')₂,Fv,FVTCR,Fd,dAb或单链Fv。抗体也可以是轻链或重链二聚体,或其任何最小片段,例如美国专利号4,946,778中所述的Fv或单链构建体,其内容通过引用方式明确纳入本文。

[0152] 在一些实施方式中,可用于本发明双特异性分子的抗体是大鼠,鼠,人,嵌合或人源化单克隆抗体。

[0153] 双特异性分子与其特定靶标的结合可以通过例如酶联免疫吸附试验(ELISA),放射免疫试验(RIA),FACS分析,生物试验(例如生长抑制)或蛋白质印迹试验来证实。这些试验中的每一种通常通过使用对感兴趣的复合物具有特异性的带标记的试剂(例如抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0154] 在本发明的一个实施方式中,双特异性抗体是包含四个抗原结合区的四价抗体。在一个优选的实施方式中,抗体包含靶向第一抗原的两个Fab结构域,且每个都由重链和轻链Fab区组成。它们以与天然IgG的Fab相同的构象排列。该抗体还包含靶向第二抗原的两个嵌合Fab结构域,它们由两个嵌合多肽结构域组成,各嵌合多肽结构域分别包含嵌合“重”链和嵌合“轻”链,所述嵌合“重”链包含可变重链结构域,所述可变重链结构域通过其C端连接至T细胞受体(TCR)的 α 或 β 链的恒定区的N端,所述嵌合“轻”链包含可变轻链结构域,所述可变轻链结构域通过其C端连接到TCR的 β 或 α 链的恒定区的N端。嵌合的“重”链和“轻”链排列成嵌合Fab结构域,其通过将嵌合“重”链的TCR的 α 或 β 链的恒定区的C端连接到天然Fab结构域的重链的可变区的N端来连接到天然Fab结构域。因此,整体对称结构产生以二价方式靶向两种不同抗原中各者的双特异性抗体,从而靶向第一抗原的天然Fab结构域和靶向第二抗原的嵌合Fab结构域存在于此类四价抗体的双臂上。

[0155] 在另一个实施方式中,嵌合Fab结构域位于Fc结构域的近端,从而包含嵌合“重”链的TCR恒定区的 α 链或 β 链的恒定区的C末端连接到天然铰链的N末端,且天然Fab结构域位于Fc结构域的远端,从而包含天然Fab结构域的重链CH1结构域的C末端连接到包含嵌合Fab结构域的可变重链的N末端。

[0156] 在另一个实施方式中,采用不对称三价形式,其包含两个不同的抗体臂,从而一个臂具有单个Fab结构域(天然或嵌合),并且双特异性抗体的第二个臂具有两个Fab结构域(天然和嵌合),如上所述。两个不同臂的异二聚化是通过Fc域中的抗体工程改造实现的,如本领域中所描述的那样进行(例如,纽扣(knobs-into-wholes),静电转向等)。

[0157] 在又一个实施方式中,可以采用不对称二价形式,其包含两个不同的抗体臂,从而一个臂具有单个Fab结构域(天然或嵌合),而另一个臂也具有单个Fab结合域(嵌合或天然)。两个不同臂的异二聚化是通过Fc域中的抗体工程改造实现的,如本领域中所充分描述的那样进行(例如,纽扣,静电转向等)。

[0158] 糖基化

[0159] 另一种类型的共价修饰是糖基化的改变。例如,可以制备无糖基化抗体(即缺乏糖基化的抗体)。可以改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲合性。此类碳水化合物修饰可通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点的一个或多个氨基酸取代,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲合性。这种方法在Co等的美国专利5,714,350和6,350,861中有更详细的描述,可以通过去除第297位的天冬酰胺来实现。

[0160] 抗体的另一类共价修饰包括将抗体连接至各种非蛋白质聚合物,包括但不限于各种多元醇,例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯,以例如描述于以下文献中的方式进行:内克塔治疗公司(Nektar Therapeutics)的2005-2006PEG目录(可从Nektar网站获得)美国专利4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337,以引用其全文方式纳入本文。此外,如本领域已知的,可以在抗体中的不同位置进行氨基酸取代以促进聚合物例如PEG的添加。参见例如美国公开号2005/0114037A1,其通过引用其全文方式纳入本文。

[0161] 在其它实施方式中,例如在将本发明的抗体用于诊断或检测目的时,抗体可包含标记物。本文中的“(带)标记(的)”是指化合物具有至少一个连接的部分、元件、同位素或化学化合物以能够检测该化合物,如Richard P.Haugland所著的《分子探针手册》(Molecular Probes Handbook)第6版中所述,其通过明确引用其全文方式纳入本文。

[0162] 生产本发明抗体的方法

[0163] 本发明还提供了产生所公开的抗SLAMF6抗体的方法。这些方法包括培养含有编码本发明抗体的分离核酸的宿主细胞。正如本领域技术人员所理解的,这可以以多种方式进行,这取决于抗体的性质。在一些实施方式中,在本发明的抗体是全长传统抗体的情况下,例如,可以使含有编码重链可变区和轻链可变区的核酸的宿主细胞在一定条件下培养,该条件使得能够产生并能够分离抗体。

[0164] 本发明抗体的可变重链和轻链在本文中公开(蛋白质和核酸序列);正如本领域所理解的,这些可以很容易地被扩大以产生全长的重链和轻链。也即,在已提供编码如本文概述的 V_H 和 V_L 区段的DNA片段的情况下,这些DNA片段可以通过标准重组DNA技术进一步操作,例如,以将可变区基因转变成全长抗体链基因,Fab片段基因,或scFv基因。在这些操作中,编码 V_L 或 V_H 的DNA片段与编码另一种蛋白质(例如抗体恒定区或柔性接头)的另一DNA片段操作性地连接。在上下文中使用的术语“操作性连接”旨在表示两个DNA片段连接以使由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在阅读框内。

[0165] 编码 V_H 区的分离的DNA可通过将编码 V_H 的DNA操作性连接至编码重链恒定区(C_{H1} , C_{H2} 和 C_{H3})的另一DNA分子而被转换成全长重链基因。大鼠重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat,E.A.等.(1991)《热门免疫学蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生与公共服务部,NIH公开号91-

3242), 并且包含这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM或IgD恒定区。在一个优选的实施方式中, 重链恒定区是IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因, 编码 V_H 的DNA可以操作性地连接到仅编码重链 C_H1 恒定区的另一DNA分子。

[0166] 编码 V_L 区的分离的DNA可以通过将编码 V_L 的DNA操作性地联接到编码轻链恒定区 C_L 的另一DNA分子而被转化成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。大鼠轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如, Kabat, E.A.等.(1991)《热门免疫学蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第五版, 美国卫生与公共服务部, NIH公开号91-3242), 并且包含这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。在一个优选的实施方式中, 轻链恒定区是 κ 或 λ 恒定区。

[0167] 为了建立编码scFv抗体片段的多核苷酸序列, 编码 V_H 和 V_L 的DNA片段被操作性地连接到编码柔性接头的另一片段, 例如, 编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃的另一片段, 从而 V_H 和 V_L 序列可被表达为连续的单链蛋白, 其中 V_L 和 V_H 区通过柔性接头连接(参见例如, Bird等(1988) Science 242:423-426; Huston等.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty等, (1990) Nature 348:552-554)。

[0168] 本发明的方面包括编码本发明抗体的核酸。此类多核苷酸编码每条重链和轻链的可变区和恒定区, 但根据本文所述的组合物, 本发明还考虑了其他组合。本发明的方面包括源自公开的多核苷酸和与这些多核苷酸互补的核酸序列的寡核苷酸片段。

[0169] 根据本发明的实施方式的多核苷酸可以是或可包括RNA, DNA, cDNA, 基因组DNA, 核酸类似物和合成DNA。在一些实施方式中, DNA分子可以是双链或单链的, 如果是单链, 则可以是编码(有义)链或非编码(反义)链。编码多肽的编码序列可以与本文提供的编码序列相同或可以是不同的编码序列, 由于遗传密码的冗余或简并性, 该序列编码与本文提供的DNA相同的多肽。

[0170] 在一些实施方式中, 将编码本发明抗体的核酸纳入表达载体中, 所述表达载体可以是染色体外的或设计为整合到其被引入的宿主细胞的基因组中。表达载体可以包含任何数量的合适的调控序列(包括但不限于转录和翻译控制序列, 启动子, 核糖体结合位点, 增强子, 复制起点等)或其它组分(选择基因等), 所有这些都是操作性地连接的, 如本领域熟知。在一些情况下, 使用两种核酸并将其各自置入不同表达载体中(例如, 第一表达载体中的重链, 第二表达载体中的轻链), 或者它们可以被置入相同的表达载体中。本领域技术人员将理解, 表达载体的设计, 包括调控序列的选择, 可能取决于例如宿主细胞的选择, 所需蛋白质的表达水平等因素。

[0171] 一般而言, 可以使用适合所选宿主细胞的任何方法(例如, 转化, 转染, 电穿孔, 感染)将核酸和/或表达引入合适的宿主细胞以产生重组宿主细胞, 从而使一个或多个核酸分子与一个或多个表达控制元件操作性地连接(例如, 在载体中, 在由细胞中加工产生的构建体中, 整合到宿主细胞基因组中)。所得的重组宿主细胞可以保持在适合表达的条件下(例如, 在诱导剂的存在下, 在合适的非人动物中, 在补充有合适的盐, 生长因子, 抗生素, 营养补充剂等的合适的培养基中), 由此产生编码的多肽。在一些实施方式中, 重链和轻链在同一宿主细胞中产生。在一些实施方式中, 重链在一个宿主细胞中产生而轻链在另一个宿主细胞中产生。

[0172] 可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域已知的,包括可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)(弗吉尼亚州弗吉尼亚州马纳萨斯获得的许多永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,HEK293细胞,FS293,Expi293,NS0细胞,HeLa细胞,幼仓鼠肾(BHK)细胞,猴肾细胞(COS),人肝细胞癌细胞(例如HepG2)和许多其它细胞系。包括但不限于细菌,酵母,昆虫和植物的非哺乳动物细胞也可用于表达重组抗体。在一些实施方式中,抗体可以在转基因动物例如牛或鸡中产生。

[0173] 用于抗体分子生物学,表达,纯化和筛选的一般方法是众所周知的,例如,参见美国专利号4,816,567,4,816,397,6,331,415和7,923,221,以及《抗体工程改造》(Antibody Engineering),Kontermann和Dubel编,施普林格出版社(Springer),海德堡,2001和2010Hayhurst和Georgiou,2001,Curr Opin Chem Biol 5:683-689;Maynard和Georgiou,2000,Annu Rev Biomed Eng 2:339-76;和Morrison,S.(1985)Science 229:1202。

[0174] 药物组合物

[0175] 本发明的方面包括组合物,例如药物组合物,其含有与药学上可接受的运载体一起配制的本发明的一种或多种(或组合)抗体或其抗原结合部分。这样的组合物可以包括本发明的一种或多种(例如,两种或更多种不同的)抗体或双特异性分子的组合。例如,本发明的药物组合物可包含结合靶抗原上的不同表位或具有互补活性的抗体的组合。

[0176] 本发明的药物组合物也可以联合疗法给药,即与其它药剂联合给药。例如,联合疗法可以包括本发明的抗体与至少一种其它抗肿瘤剂或抗炎剂或免疫抑制剂的组合。可用于联合治疗的治疗剂的示例在下文关于本发明抗体的用途的部分中更详细地描述。

[0177] 如本文所用,“药学上可接受的运载体”包括生理上相容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,运载体适于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮给予(例如,通过注射或输注)。根据给药途径,活性化合物,即抗体或抗体片段,可以包被在材料中以保护化合物免受酸和其它可能使化合物失活的自然条件的作用。

[0178] 本文所述药物组合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的所需生物活性并且不产生任何不希望毒理学作用的盐(参见例如Berge,SM等.(1977)J.Pharm.Sci.66:1-19)。本发明的药物组合物还可包括药学上可接受的抗氧化剂。可用于本文所述药物组合物中的合适的水性和非水性运载体的例子包括水,乙醇,多元醇(例如甘油,丙二醇,聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油,例如橄榄油和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料(例如卵磷脂),通过在分散系的情况保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。

[0179] 这些组合物还可包含佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌步骤(见上)和加入各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等确保防止微生物的出现。组合物中也可能需要包含等渗剂,如糖、氯化钠等。此外,可通过加入能延迟吸收的物质例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0180] 药学上可接受的运载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。药学活性物质的这类介质和试剂的用法是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂都与活性化合物不相容,否则应考虑在本发明的药物组合物中使用这些介质或试剂。补充性活性化合物也可掺入所述组合物。

[0181] 给药方案经调节能提供最优的所需效果(例如治疗效果)。例如,可以是一次推注,按时间分次给药或根据治疗情况的紧急性成比例地降低或增加剂量。尤其有利的是配制成单位剂型的胃肠道外组合物以便于给药和剂量均一性。本文中单位剂型指作为单个剂量用于待治疗对象的物理上离散的单位,每个单位包含预定量的活性化合物与所需药物运载体,该预定量经测算能够产生所需治疗效果。本发明中剂量单位形式的规格取决于或直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和待实现的具体治疗效果,以及(b)复合这种活性化合物用于个体中治疗灵敏度的领域中的固有限制。

[0182] 对于抗体的给予,剂量范围可为约0.0001至100mg/kg,约0.001至50mg/kg,约0.001至10mg/kg,约0.01至10mg/kg,并且更通常为0.01至5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是0.1mg/kg,0.2mg/kg,0.3mg/kg,0.4mg/kg,0.5mg/kg,0.75mg/kg体重,1mg/kg体重,3mg/kg体重,4mg/kg体重,5mg/kg体重,7.5mg/kg体重或10mg/kg体重,或在0.1-5mg/kg或1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每天,隔天,每周两次,每周一次,每两周一次,每三周一次,每四个星期一次,每月一次,每三个月一次或每三到六个月一次给予。本发明的抗SLAMF6抗体的优选给药方案包括通过静脉内给予1mg/kg体重,3mg/kg,5mg/kg或10mg/kg体重,使用以下给药方案之一给予抗体:(i)每周六剂,然后每月给予;(ii)每周给予;(iii)3mg/kg体重一次,然后每周1mg/kg体重。

[0183] 在一些方法中,同时给予具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体,在这种情况下,给予的每种抗体的剂量在所指示的范围内。在一些实施方式中,在多种情况下给予抗体。单次剂量之间的间隔可以是例如每周,每月,每三个月或每年。间隔也可以是不规则的,如测量患者体内针对靶抗原的抗体的血液水平所指示。在一些实施方式中,调整剂量以实现约1-1000 μ g/ml的血浆抗体浓度,并且在一些方法中达到约25-300 μ g/ml。

[0184] 在一些实施方式中,抗体可以作为缓释制剂给予,在这种情况下需要较少的给予频率。剂量和频率取决于患者体内抗体的半衰期。一般来说,人抗体的半衰期最长,其次是人源化抗体,嵌合抗体和非人抗体。给药的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在很长一段时间内以相对不频繁的间隔给予相对低的剂量。一些患者在他们的余生中继续接受治疗。在治疗应用中,有时需要在相对较短的间隔内使用相对高的剂量,直到疾病的进展减缓或终止,优选直到患者表现出疾病症状的部分或完全改善。此后,可以向患者给予预防方案。

[0185] 本文所述药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以各不相同,从而获得就具体患者、组合物与给药方式而言能够有效获得所需治疗反应且对患者无毒的活性成分的量。所选剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用本文所述特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,所用具体化合物的排出速率,治疗时长,与所用特定组合物联用的其它药物、化合物和/或物质,受治患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康状况和既往医疗史等医药领域众所周知的因素。

[0186] 本发明抗体的“治疗有效剂量”优选导致疾病症状严重性降低,无疾病症状期的频率和持续时间增加,或预防由于疾病折磨引起的损伤或残疾。例如,相对于未治疗的对象,“治疗有效剂量”优选抑制细胞生长或肿瘤生长至少约10%,至少约20%,至少约30%,更优选至少约40%,至少约50%,甚至更优选至少约60%,至少约70%,并且仍更优选至少约80%,至少约90%或至少约95%。可以在预测人类肿瘤功效的动物模型系统中评估化合物

抑制肿瘤生长的能力。或者,可以通过检查化合物抑制细胞生长的能力来评价组合物的这种特性,这种抑制可以通过技术人员已知的试验在体外测量。治疗有效量的治疗化合物可以减小肿瘤大小,或以其它方式改善对象的症状。本领域普通技术人员将能够基于例如对象的体型,对象症状的严重程度和所选择的特定组合物或给药途径等因素来确定这样的量。

[0187] 本发明的组合物可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种通过一种或多种给药途径给药。本领域技术人员会明白,给药途径和/或方式根据所需结果而有所不同。本发明抗体的优选给药途径包括静脉内,肌肉内,皮内,腹膜内,皮下,脊髓或其它肠胃外给药途径,例如通过注射或输注。本文所用短语“胃肠道外给药”表示除肠道和局部给药外的给药形式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下(subcapsular)、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注给药。

[0188] 或者,本发明的抗体可通过非肠胃外途径给药,例如局部、表皮或粘膜给药途径,例如鼻内、口腔、阴道、直肠、舌下或局部给药。

[0189] 活性化合物可以与保护化合物免于快速释放的运载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物,透皮贴剂和微囊化递送系统。可利用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法已获得专利或为本领域技术人员公知(参见例如,《缓释与控释药物递送系统》(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems) (1978) J.R. Robinson编,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约州)。

[0190] 在某些实施方式中,可以配制本发明的单克隆抗体以确保适当的体内分布。例如,血脑屏障(BBB)排除了许多高度亲水的化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过BBB(如果需要),它们可以被配制在例如脂质体中。对于制造脂质体的方法,参见例如美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包含一个或多个选择性地向特定细胞或器官内转运的部分,由此增强靶向性药物递送(参见例如V. V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如美国专利5,416,016.);甘露糖苷(Umezawa等.(1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038);抗体(P. G. Bloeman等.(1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais等.(1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180);表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等.(1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier等.(1994) J. Biol. Chem. 269:9090);还参见K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

[0191] 用途和方法

[0192] 本发明的抗体,抗体组合物和方法具有多种体外和体内诊断和治疗效用,包括免疫介导的疾病的诊断和治疗。

[0193] 在一些实施方式中,这些分子可以体外或离体给予于培养的细胞,或给予于人类对象,例如在体内,以治疗,预防和/或诊断多种疾病。本文所用术语“对象”旨在包括人和非人动物。非人类动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物,例如非人类灵长类动物和非哺乳动物。优选的对象包括人类患者。当本发明的抗体与另一种药剂一起给予时,两者可以以任一顺序或同时给予。

[0194] 鉴于本发明的抗体与SLAMF6的特异性结合,本发明的抗体可用于特异性检测免疫细胞表面SLAMF6的表达,此外,还可用于通过免疫亲和纯化来纯化SLAMF6。

[0195] 此外,鉴于SLAMF6在免疫细胞上的表达,本发明的抗体,抗体组合物和方法可用于治疗患有致瘤性病症的对象,例如以存在肿瘤细胞为特征的病症,例如小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,GIST,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0196] 在一个实施方式中,本发明的抗体用于治疗癌症,例如小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结肠直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,胃肠道间质瘤,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0197] 在其它实施方式中,本发明的抗体用于制备用于治疗癌症的药物,例如小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结肠直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,胃肠道间质瘤,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0198] 在一个实施方式中,本发明的抗体(例如,单克隆抗体,抗体片段,Nanobody™,多特异性和双特异性分子和组合物等)可用于检测SLAMF6的水平,或在其膜表面上含有SLAMF6的免疫细胞的水平,然后将这些水平与某些疾病症状联系起来进行诊断。

[0199] 在另一个实施方式中,本发明的抗体(例如,单克隆抗体,多特异性和双特异性分子和组合物)可以用于初始时测试与体外治疗或诊断用途相关的结合活性。例如,可以使用以下实施例中描述的流式细胞术试验来测试本发明的组合物。

[0200] 在一些实施方式中,本发明的抗体(例如,单克隆抗体,多特异性和双特异性分子和组合物)在疾病的治疗和诊断中具有其它效用。例如,单克隆抗体,多特异性或双特异性分子可用于在体内或体外引发一种或多种以下生物活性:诱导和/或增强免疫细胞的活化;在表达SLAMF6的人类效应细胞存在的情况下介导细胞的吞噬作用或ADCC,或阻止SLAMF6配体与SLAMF6结合。

[0201] 在一个具体实施方式中,抗体(例如,单克隆抗体,多特异性和双特异性分子和组合物)在体内用于治疗,预防或诊断多种疾病。相关疾病的示例包括,例如,代表以下的人类癌症组织:小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结肠直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,胃肠道间质瘤,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0202] 体内和体外给予本发明的抗体组合物(例如,单克隆抗体,多特异性和双特异性分子和组合物)的合适途径是本领域公知的并且可由普通技术人员选择。例如,抗体组合物可以通过注射(例如,静脉内或皮下)给药。所用分子的合适剂量将取决于对象的年龄和体重

以及抗体组合物的浓度和/或制剂。

[0203] 如前所述,本发明的抗体可以与一种或多种其它治疗剂例如免疫刺激剂,细胞毒剂,放射毒剂或免疫抑制剂共同给予。抗体可以与试剂连接(免疫复合物形式)或可以与试剂分开给予。在后一种情况下(分开给药),抗体可以在药剂之前,之后或同时给药,或者可以与其它已知疗法(例如抗癌疗法,例如放射疗法)共同给药。此类治疗剂包括抗肿瘤剂,例如多柔比星(阿霉素),顺铂硫酸博来霉素,卡莫司汀,苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲,它们本身仅在对患者有毒或亚毒的水平下有效。适合于与本发明的抗体共同给予的其它药剂包括用于治疗癌症的药剂,如Avastin[®],5FU和吉西他滨。本发明的抗SLAMF6抗体或其抗原结合片段与化学治疗剂的共同给药提供了两种抗癌剂,它们通过不同的机制起作用,对人肿瘤细胞产生细胞毒性作用。这种共同给药可以解决由于对药物产生抗药性或肿瘤细胞抗原性变化而引起的问题。

[0204] 靶特异性效应细胞,例如与本发明的组合物(例如,单克隆抗体,多特异性和双特异性分子)连接的效应细胞也可以用作治疗剂。用于靶向的效应细胞可以是人类白细胞,例如巨噬细胞,中性粒细胞或单核细胞。其它细胞包括嗜酸性粒细胞,自然杀伤细胞和其它携带IgG或IgA受体的细胞。必要时,可以从待治疗的对象获得效应细胞。靶特异性效应细胞可以作为细胞在生理上可接受的溶液中的悬浮液给予。给予的细胞数量可以是 10^8 - 10^9 的数量级,但将根据治疗目的而变化。

[0205] 靶特异性效应细胞的治疗可以与其它技术结合进行。例如,使用本发明的组合物(例如,单克隆抗体,多特异性和双特异性分子)和/或配备有这些组合物的效应细胞的抗肿瘤疗法可以与化学疗法结合使用。此外,联合免疫疗法可用于将两种不同的细胞毒性效应物群体导向肿瘤细胞排斥。

[0206] 本发明的双特异性和多特异性分子还可用于调节效应细胞上的Fc γ R或Fc γ R水平,例如通过加帽和消除细胞表面上的受体进行调节。抗Fc受体的混合体也可用于此目的。

[0207] 本发明的方面包括试剂盒,其包含本发明的抗体组合物(例如,单克隆抗体,双特异性或多特异性分子)和它们的使用说明,例如用于治疗癌症。所述试剂盒还可包含一种或多种其它试剂,例如免疫抑制剂,细胞毒剂或放射毒剂,或本发明的一种或多种其它抗体(例如,具有与SLAMF6抗原的表位结合的互补活性的、不同于第一抗体的抗体)。

[0208] 因此,用本发明的抗体组合物治疗的患者可以(在给予本发明的抗体之前,同时或之后)另外给予另一种治疗剂,例如细胞毒剂或放射毒剂,其增强或放大所述抗体的治疗效果。

[0209] 在其它实施方式中,对象可用某一药剂进一步治疗,所述药剂调节,例如增强或抑制,Fc γ 或Fc γ 受体的表达或活性,例如用细胞因子治疗对象。在用多特异性分子治疗期间给予的优选细胞因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF),粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。

[0210] 本发明的组合物(例如,抗体,多特异性和双特异性分子)还可用于靶向表达Fc γ R或SLAMF6的细胞,例如,用于标记此类细胞。对于这种用途,可以将结合剂与可检测的分子连接。因此,本发明提供了用于离体或体外定位表达Fc受体例如Fc γ R或SLAMF6的细胞的方法。可检测标记物可以是例如放射性同位素,荧光化合物,酶或酶辅因子。

[0211] 在一个具体实施方式中,本发明提供了用于检测样品中SLAMF6抗原的存在或测量

SLAMF6抗原的量的方法,包括将样品和对照样品与单克隆抗体或其抗原结合部分(其特异性地结合至SLAMF6)在允许所述抗体或其部分与SLAMF6之间形成复合物的条件下接触。然后检测复合物的形成,其中样品相比对照样品在复合物形成方面的差异指示样品中存在SLAMF6抗原。

[0212] 在其它实施方式中,本发明提供了治疗对象中免疫介导的病症的方法,例如人类癌症,小细胞肺癌,非小细胞肺癌(包括鳞癌和腺癌),皮肤癌包括黑色素瘤,乳腺癌(包括TNBC),结肠直肠癌,胃癌,卵巢癌,宫颈癌,前列腺癌,肾癌,肝癌包括肝细胞癌,胰腺癌,头颈癌,鼻咽癌,食道癌,膀胱癌和其它尿路上皮癌,胃癌,胶质瘤,胶质母细胞瘤,睾丸,甲状腺,骨,胆囊和胆管,子宫癌,肾上腺癌,肉瘤,胃肠道间质瘤,神经内分泌肿瘤和血液系统恶性症。

[0213] 本说明书中引用的所有参考文献,包括但不限于所有论文,出版物,专利,专利申请,演示文稿,文本,报告,手稿,手册,书籍,互联网张贴,期刊文章,期刊,产品情况说明书等,特此一份以引用的方式将其全部内容纳入本说明书。此处对参考文献的讨论仅旨在总结其作者所作的断言,并不承认任何参考文献构成现有技术,并且申请人保留质疑所引用参考文献的准确性和相关性的权利。

[0214] 虽然出于阐明目的已经通过说明和举例的方式详细描述了本发明,但本领域普通技术人员根据本发明的教导不难了解,可以在不背离所附权利要求书的构思或范围的情况下做出某些改变和修改。

[0215] 通过以下实施例进一步说明本发明,但不应将其解释为进一步限制。提供以下实施例,序列列表和附图以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求中阐述。应理解,在不脱离本发明的精神的情况下,可以对所阐述的方式进行修改。

[0216] 实施例:

[0217] 实施例1:抗体生成和筛选。

[0218] 杂交瘤生成

[0219] 重组ECD蛋白用于免疫小鼠,以在圣迭戈的美艾利尔(AIere)产生针对hu SLAMF6 ECD (SEQ ID NO:12)的小鼠Fab。来自免疫小鼠的-SLAMF6-hum.ECD脾细胞用于使用行业标准技术生成fab文库。

[0220] 二次筛选

[0221] 测试Fab上清液与Raji细胞和活化PBMC表面表达的SLAMF6蛋白的结合。用FACS缓冲液以1:10份稀释上清液。

[0222] 实施例2:SLAMF6单克隆抗体的结构表征。

[0223] 使用标准PCR技术获得编码单克隆抗体重链和轻链可变区的cDNA序列,并使用标准DNA测序技术进行测序。从筛选中选择的1B3的重链和轻链可变区可见于图1。

[0224] 1B3的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:3和1。

[0225] 1B3的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:4和2。

[0226] 使用Kabat系统的CDR区确定进行的1B3 VH序列的进一步分析获得对于重链CDR1, CDR2和CDR3区的描绘,分别如SEQ ID NO:5,6和7所示。图1a显示1B3 VH序列,其中框示CDR1,CDR2和CDR3。

[0227] 使用Kabat系统的CDR区确定进行的1B3 VL序列的进一步分析获得对于轻链CDR1,

CDR2和CDR3区的描绘,分别如SEQ ID NO:8,9和10所示。图1b显示1B3 VL序列,其中框示CDR1,CDR2和CDR3。

[0228] 实施例3:通过流式细胞术分析确定的Fab上清液单克隆抗体针对SLAMF6的特异性。

[0229] 将 5×10^6 个Raji细胞置于96孔板的各孔中并用FACS缓冲液(DPBS,2%FBS)洗涤1次。通过在1200rpm下旋转5分钟使细胞沉淀。将沉淀用FACS缓冲液(DPBS,2%FBS)洗涤1次,并通过以1200rpm旋转5分钟再次沉淀,并重新悬浮在FACS缓冲液中。测试抗体在FACS缓冲液中稀释至30nM/l,并将如图4所示的递增量添加到在冰上孵育30分钟各孔中。然后,细胞用FACS缓冲液(DPBS,2%FBS)洗涤1次,并在FACS缓冲液中沉淀,洗涤并重悬。山羊抗小鼠二抗被稀释至 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}$,每孔加入 $100 \mu\text{l}$,使板在冰上孵育30分钟,然后用FACS缓冲液(DPBS,2%FBS)洗涤1次。细胞被沉淀并重悬于 $200 \mu\text{l}$ FACS缓冲液中。使用Guava EasyCyte Plus HT流式细胞仪读样,并使用Guava Cytosoft软件套件分析结果。

[0230] 从图4可以看出,抗体1B3显示与表达SLAMF6的Raji细胞的特异性剂量依赖性结合。

[0231] 实施例4:抗SLAMF6抗体活化T细胞和刺激IFN γ 产生的能力。

[0232] 96孔非组织培养板在4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 $250 \text{ng}/\text{ml}$ OKT3和不同浓度的抗SLAMF6抗体/同种型被覆过夜。板用PBS洗涤两次,然后用R10培养基(含10%FBS,1%L-谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素的RPMI)封闭30分钟。封闭后,10万个T细胞被重新悬浮至 $100 \mu\text{l}$ R10培养基中并添加到平板上(根据制造商的说明,使用Miltenyi试剂盒,代码:130-096-535,从PBMC分离出T细胞)。板在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育72小时,收集上清液并稀释以用于IFN γ ELISA试验。

[0233] 按照制造商的说明,使用IFN- γ DuoSet ELISA试剂盒(R&D systems目录号DY285B)测量IFN γ 。

[0234] 结果

[0235] 与W02017/004330中描述的针对SLAMF6的西雅图遗传学公司(Seattle Genetics)抗体相比,人源化抗体Hu_1B3在OKT3预活化的T细胞中显示增强的活性,反映在较低抗体浓度下增加的IFN γ 产生(图5)。这种IFN γ 生成的诱导表明,针对SLAMF6的抗体将对免疫系统受抑制的患者产生治疗作用。

[0236] 实施例5:抗体1B3的人源化。

[0237] 使用CDR移植技术进行鼠1B3单克隆抗体的人源化。为了指导人源化过程并协助决定保留亲本鼠残基或用它们的人种系对应物替代它们,建立了1B3鼠单克隆抗体Fv的同源分子模型。

[0238] CDR的定义基于Kabat命名法。通过使用IgBLAST搜索IMGT鼠和人V基因数据库来完成移植1B3大鼠CDR区的人框架受体区的选择,IgBLAST在NCBI开发以促进免疫球蛋白V区序列的分析,以1B3鼠可变区序列作为输入。应用的策略是使用人类种系序列,这些序列是不包含在个体人类抗体序列中存在的特异体细胞突变的天然人类序列。

[0239] 重链设计

[0240] 分离自小鼠1B3杂交瘤细胞的VH的氨基酸序列(根据Kabat编号方案,CDR区以粗体显示)如下所示。

[0241] FR1 CDR1 FR2 CDR2
 QVQLKQSGAELVLRPGTSVKVSKASGYAFT**NYLIE**WVKQRPGQGLEWIG**VINPGSGGTNYNEKFKD**KATLTADK
 FR3 CDR3 FR4
 SSNTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARR**GWDFDY**WGWGQGTTLTVSS

[0242] 人类框架受体VH区域的选择

[0243] 通过使用IgBLAST以鼠VH区氨基酸序列作为输入搜索IMGT人VH基因数据库来完成移植1B3鼠CDR区的人框架受体VH区的选择。基于亲本抗体与人种系的序列比对,鉴定了最接近的匹配条目。作为受体的最佳人种系的鉴定基于以下有序标准:Kabat定义的跨框架的序列同一性,以及链间界面残基和支持环与亲本CDR的规范构象的同一性和/或兼容性。人种系IGHV1-2*02被选为最合适的重链。

[0244] 使用IGHV1-2*02人类种系作为框架受体区域的设计

[0245] 人源化形式

[0246] 将Kabat命名法定义的鼠CDR(粗体)移植到IGHV1-2*02中以获得以下详细序列。许多残基是框架鼠残基(CDR残基之外),即自亲本鼠1B3VH序列保守;它们之所以保守,是因为它们在结构上可能对维持抗体的全部活性很重要。

[0247] FR1 CDR1 FR2
 QVQLVQSGAEVKKPGAS**VKV**SCKASGYAFT**NYLIE**WVRQAPGQGLEWIG
 CDR2 FR3
VINPGSGGTNYNEKFQGRVTLTADKSI**STAYMEL**SRLRSDDTAVYYCAR

[0248] 86.7%相同性(V基因中总共98个残基中有85个相同的残基)的

[0249] 人源化形式(OBT577-12-VHB),采用IGHV1-2*02人种系。

[0250] 轻链设计

[0251] 小鼠1B3 VL的氨基酸序列(如Kabat命名法定义的CDR区突出显示)如下所示。

[0252] FR1 CDR1 FR2 CDR2
 QIVLTQSPALMSTSPGEEKVTMT**CSASSVS**YIYWFQQKPGSSPKPWIY**RTSNLAS**
 FR3 CDR3 FR4
 GVPARFSGSGSGTSYS**SLTIS**SMEAE**DAATYYCQQWD**NNPYTFGGG**TKLEIK**

[0253] 人类框架受体VL区域的选择

[0254] 通过使用IgBLAST以鼠VL区氨基酸序列作为输入搜索IMGT人VL基因数据库来完成移植1B3 VL鼠CDR区的人框架受体VL区的选择。基于亲本抗体与人种系的序列比对,鉴定了最接近的匹配条目。作为受体的最佳人种系的鉴定基于以下有序标准:Kabat定义的跨框架的序列同一性,以及链间界面残基和支持环与亲本CDR的规范构象的同一性和/或兼容性。根据该分析,人类种系IGKV1-33*01似乎是作为人类框架受体区域的最佳选择。因此,该人类种系用于人源化形式的设计。

[0255] 使用IGKV1-33*01人类种系作为框架受体区域的设计

[0256] 人源化形式

[0257] 将Kabat命名法定义的鼠CDR移植到IGKV1-33*01中以获得以下详细序列。保留了对于维持抗体完全活性具有结构重要性的多个残基。由此产生了具有86.3%同一性(95个氨基酸残基中82个相同)的人源化形式。

	FR1	CDR1	FR2
[0258]	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDVSYIYWYQQKPGKAPKRWIY		
	CDR2	FR3	CDR3
	RTSNLATGVPSRFSGSGSGTDYTFRTISSLQPEDYATYYCQQWDDNP		

[0259] 86.3% 相同性 (82/95) 的人源化形式, 采用 IGKV1-33*01 人类种系

[0260] 实施例6: 具有肿瘤浸润淋巴细胞的 ELISPOT。

[0261] 来自 NSCLC (图6), 乳腺癌 (图7) 或 CRC (图8) 肿瘤的原发性肿瘤来源的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 用 10 μ g/ml 的鼠 1B3 或派姆单抗和在完全 IMDM 培养基中稀释至 1 μ g/ml 的 OKT3 刺激 96 小时。刺激后收获 TIL, 计数并以 100000 个细胞/孔接种在 IFN γ ELISPOT 板 (Mabtech) 上。板在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 小时, 然后根据制造商的说明进行显影。使用 ImmunoSpot[®] 系列 5ELISPOT 分析仪读取点数, 使用 GraphPad Prism 软件分析数据。

[0262] 图6显示抗体 1B3 活化非小细胞肺癌衍生的 TIL, 这反映了比同种型抗体显著更高的 IFN γ 产量。

[0263] 图7显示, 与派姆单抗相比, 抗体 1B3 活化显著更多的乳腺癌衍生 TIL 以产生 IFN γ 。

[0264] 图8显示, 与派姆单抗相比, 抗体 1B3 活化显著更多的结直肠癌衍生 TIL 以产生 IFN γ 。

[0265] 实施例7: 人源化 1B3 抗体的结合亲和性。

[0266] 结合亲和性实验在 Biacore T-200 上于 25 $^{\circ}$ C 进行。CM5 芯片的流动池 2, 3 和 4 用最大量 500RU 的山羊抗人 IgG 被覆。在流动池 2, 3 和 4 上捕获测试抗体。流通池 1 保持空白并用于参考扣除。抗原流过芯片。实时监测抗原与抗体的结合。根据观察到的 k_{on} 和 k_{off} , 确定 KD。

[0267] 表2

样品	K_D (M)	K_A (1/M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	全 X^2
1B3	1.72×10^{-9}	5.8×10^8	5.41×10^5	9.32×10^{-4}	0.227

[0269] 实施例8: 使用抗 SLAMF6 抗体 1B3 的体外增殖试验。

[0270] 方法

[0271] 用 250ng/ml 的抗人 CD3 (eBioscience, 美国) 抗体单独被覆或与人源化抗 SLAMF6 抗体 (Hu_1B3) 或同种型对照抗体 (浓度为 0.0.2, 0.4, 0.6, 0.9 和 1.2 μ g/ml) 联用被覆非组织培养物处理的 96 孔板 (BDFalcon, 美国), 并在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天洗涤板并用 AIM V 培养基封闭。从健康供体产生的 PBMC 分离的 T 细胞用细胞增殖染料 eFluor[™]670 (eBioscience, 美国) 染色, 洗涤并接种到含有 FCS、青霉素-链霉素的 AIM V (Thermofisher Scientific, 美国) 培养基中的抗体被覆的板 (每孔 100 μ l 中 100,000 个细胞), 并在组织培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 培养 72 小时。在第 3 天, 细胞经收集并用 FITC 标记的抗人 CD8, Brilliant Violet 711[™] 标记的抗人 CD4, PE 标记的抗人 CD69 (Biolegend, 美国) 和可固定活力染料 eFluor[™]506 (eBioscience, 美国) 染色。样品在 attune NxT 流式细胞仪 (Thermofisher Scientific, 美国) 上分析, 并使用 FlowJo 软件 (TreeStar, 美国) 分析数据。

[0272] 图9显示, 与同种型或单独的 CD3 相比, 在 CD3 存在下使用抗 SLAMF6 抗体刺激分离的 T 细胞上存在的 SLAMF6 导致 T 细胞增殖显著增加。

[0273] 实施例9: 使用抗 SLAMF6 抗体 Hu_1B3 与同种异体 PBMC 的单向混合淋巴细胞反应 (MLR)。

[0274] 方法:

[0275] 将来自一名供体(供体1)的分离的T细胞重新悬浮在含有10%补充牛血清和2mM L-谷氨酰胺的RPMI1640培养基(培养基)中。

[0276] 来自第二个供体(供体2)的冷冻保存的PBMC用50ug/ml丝裂霉素C以2E6细胞/ml的密度在培养基中处理。细胞在37℃处理90分钟,然后通过用培养基洗涤去除丝裂霉素C。

[0277] 然后将来自供体1的100,000个细胞与来自供体2的100,000个丝裂霉素C处理的细胞在96孔U型底板中合并。合并的细胞用不同浓度的人源化抗体Hu_1B3和对照溶液处理,并在100ul培养基/孔的总体积中培养6天。同种型用作阴性对照,且包括抗CD137mAb用于比较。

[0278] 根据制造商的说明,在第6天收集培养物上清液并通过ELISA(R&D Systems: DY285B)测定IFN- γ 的浓度。

[0279] 图10显示抗SLAMF6抗体Hu_1B3显示细胞因子释放的剂量相关增加,表明T细胞因抗体的存在而被活化。它还表明,与通过CD137活化相比,SLAMF6的活化导致分离的T细胞释放更高的细胞因子。

[0280] 实施例10:SLAMF6介导的颗粒酶B和穿孔素从T细胞中释放。

[0281] PBMC分离

[0282] 作为T细胞分离的第一步,从血沉棕黄层(斯坦福血液中心的Leucopak)分离PBMC。血液在PBS中以1:4的比例稀释(10ml血液+30ml PBS),然后将30ml稀释的血液小心地放在15ml Ficoll-Hypaque(GE-Healthcare目录号17-1440-03)上。将管在sorrvall离心机中以400g(1400rpm)在室温下离心30分钟,其间制动关闭。单核细胞通过密度梯度分离。将来自所有管的约10ml细胞的白色分级分离部分汇集到单个50ml管中,使用Cellometer auto 2000洗涤和计数。从血沉棕黄层产生的PBMC用于T细胞分离。

[0283] T细胞分离

[0284] 从PBMC分离泛T细胞是一个负选择过程,其中除了CD4和CD8 T细胞外,全部剩余的免疫细胞亚群都用生物素偶联抗体标记,并在高磁场中被链霉亲和素包被的微珠捕获。将从血沉棕黄层分离的PBMC经洗涤并重悬于FACS分选缓冲液(PBS中的0.1%BSA)中,浓度为 2.5×10^7 个细胞/mL,将泛T细胞生物素-抗体掺混物(Cocktail)加至细胞,使用1ml移液器混合抗体细胞悬液并在冰上孵育5分钟。将泛T细胞微珠(Pan T Cell MicroBead)分离掺混物添加至混合物,然后在冰上再孵育10分钟。采用MACS分离技术来分离未接触的T细胞。使生物素标记的PBMC微珠混合物在高磁场MACS分离器中跑过LS柱(Miltneyi Biotec,目录号130-042-401),收集流穿的耗尽的非T细胞,用FACS分选缓冲液洗涤一次,然后在AIMV完全培养基(含5%FBS)中重悬。

[0285] 颗粒酶B ELISA

[0286] 对于颗粒酶B功能试验,非组织培养物处理的96孔板用人Hu_1B3或同种型对照抗体联合250ng/ml的抗人CD3(OKT3克隆)(Thermofisher Scientific目录号16-0031-85)被覆。各测试抗体以 $4.2 \mu\text{g/ml}$ 开始,以2:3稀释度进行被覆,在100 μl PBS中进行10点滴定,设三重复。将板密封并在4℃培养过夜。在颗粒酶B功能试验设置的当天,板经洗涤并用AIMV完全培养基(含5%FCS)封闭20分钟以减少非特异性结合。

[0287] 使用来自R&D系统公司(R&D systems)的Human GranzymeB DuoSet ELISA试剂盒

(目录号DY2906-05) 设置颗粒酶B免疫试验。Nunc-免疫试验板用PBS中以1:60稀释的颗粒酶B捕获抗体被覆,并将板在4℃下孵育过夜。第二天,板用ELISA洗涤缓冲液(PBS+0.05%吐温20)洗涤并用PBS中的1%BSA封闭。封闭板后,将100 μ l样品在稀释缓冲液中以1:60稀释,并将标准品加至各自的孔中,并在4℃孵育过夜。第二天将板显影,并在VersaMax可调微孔板读板仪上获取OD值。使用Graphpad Prism 8软件对颗粒酶B释放进行量化和绘图。

[0288] 结论

[0289] 颗粒酶介导的细胞凋亡是细胞毒性淋巴细胞消除转化细胞的主要机制之一。数据显示抗体Hu_1B3能够诱导对肿瘤抑制至关重要的细胞毒性功能。抗体Hu_1B3以0.51 μ g/ml的EC₅₀诱导来自活化T细胞的颗粒酶B的剂量依赖性增加(图11)。

[0290] 穿孔素细胞内试验

[0291] 穿孔素细胞内定量试验设置,非组织培养物处理的96孔板用人Hu_1B3或同种型对照抗体联合250ng/ml的抗人CD3(OKT3克隆)(Thermofisher Scientific目录号16-0031-85)被覆。各测试抗体以4.2 μ g/ml开始,以2:3稀释度进行被覆,在100 μ l PBS中进行10点滴定,设三重复。将板密封并在4℃培养过夜。在颗粒酶B功能试验设置的当天,板经洗涤并用AIMV完全培养基(含5%FCS)封闭20分钟以减少非特异性结合。对于该试验,每孔在100 μ l AIMV培养基(含5%FBS)中添加200,000个泛T细胞,并在组织培养箱中于37℃培养3天。在试验当天,将蛋白质转运抑制剂掺混物(Thermofisher Scientific,目录号00-4980-93)添加到所有孔中,并培养4小时,以防止穿孔素转运到细胞外空间。收集细胞并对T细胞表面标志物CD3,CD4和CD8进行染色,然后使用FIX&PERM™细胞透化试剂盒(Thermofisher Scientific,目录号GAS-004)进行细胞内穿孔素染色。在Attune NxT FACS分析仪(Thermofisher Scientific,马里兰州)上分析细胞,并用FlowJo软件(BD Biosciences,圣何塞)分析数据。

[0292] 结论

[0293] 穿孔素介导的坏死是细胞毒性T淋巴细胞诱导的另一种主要杀伤机制,且Hu_1B3以剂量依赖性方式增强CD8+T细胞中穿孔素的上调(图12),EC₅₀为0.44 μ g/ml。

[0294] 实施例11:评估抗体1B3的结合表位的竞争性结合试验

[0295] 将冷冻保存的人PBMC解冻并通过悬浮在FACS缓冲液(含2%FCS的DPBS)中洗涤一次,然后以1200rpm离心5分钟以沉淀细胞并弃去上清液(采用相同方法进行后续洗涤)。在再次洗涤之前,将细胞以每孔FACS缓冲液中100,000个细胞分配到96孔试验板中。然后将细胞用100nM或300nM的SLAMF6 ECD-mIgG2aFc融合蛋白封闭1小时,用于在冰上的100 μ l FACS缓冲液中进行SLAMF6受体封闭,持续1小时,然后洗涤。然后将最高浓度为10nM和1/3连续稀释滴定的人源化Hu_1B3抗体或人IgG1同种型对照添加至封闭的PBMC中,然后使细胞在冰上孵育1小时,然后洗涤两次。然后将二抗,FACS缓冲液中的浓度为1 μ g/mL的山羊抗人IgG-RPE(Southern Biotech,参考号2040-05)施加至处理的细胞,冰上持续30分钟。一个先前未处理的含有细胞的孔也用二抗染色,另一个未染色,以作为二抗结合的对照。在最终孵育后,将细胞再次洗涤两次,并将最终的细胞沉淀重新悬浮在FACS缓冲液中。根据行业标准方案,使用Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fischer Scientific)以96孔板形式确定各样品的二抗的平均荧光强度,并使用FlowJo分析软件分析原始数据。

[0296] 如图13中所见,在人SLAMF6 ECD-mIgG2a Fc融合蛋白的存在下,Hu_1B3抗体被阻

断从而无法与PBMC表面上的受体结合,表明Hu_1B3与人SLAMF6 ECD竞争性结合。因此,可以认为Hu_1B3与SLAMF6的同源二聚化表位结合,并通过SAP介导的活化途径增强细胞毒性T细胞功能,起到激动剂抗体的作用。

[0297] 实施例12:Hu_1B3抗体的内化

[0298] RAJI,人伯基特氏淋巴瘤细胞(目录号CCL-86,美国典型培养物保藏中心[ATCC],弗吉尼亚主马纳萨斯)在RPMI-1640培养基(Cellgro,目录号10-041-CM,Mediatech,弗吉尼亚州马纳萨斯)中生长,该培养基并补充有10%胎牛血清(HyClone*Cosmic小牛血清,目录号SH30087-03,Thermo Scientific,马萨诸塞州沃尔瑟姆)和1%丙酮酸钠(Cellgro,目录号#25-000-C1),使用行业标准无菌技术。

[0299] Raji细胞以 5×10^5 细胞/孔的密度在24孔细胞玻璃底培养板中铺板,并在生长培养基中于37℃允许增殖48小时。为以下样品制备孔:仅二抗对照,人IgG同种型对照,抗体Hu_1B3,临床抗SLAMF6抗体(来自西雅图遗传学公司(Seattle genetics))(阳性对照),在0小时,0.5小时,1小时,2小时,4小时和24小时。仅二抗对照孔和无抗体对照孔用作荧光对照。

[0300] 随后在冰上用冰冷的试剂进行所有抗体孵育和洗涤步骤。从孔中吸出培养基并用IF缓冲液(Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS,Thermo Scientific,弗吉尼亚州沃尔瑟姆,目录号#SH30028-03)+2%FBS)洗涤两次。将一抗(纯化的OBT人源化Hu_1B3;同种型或阳性对照抗体(Seattle Genetics))在IF缓冲液中稀释至2ug/mL,然后将200μl加到适当的孔中,持续15分钟。单独添加相同体积的IF缓冲液至指定用于二抗对照的孔。二抗(山羊抗人IgG-Alexa Fluor 488,英杰(Invitrogen)目录号A11013)在IF缓冲液中稀释至2ug/mL的浓度,然后添加至一抗孵育(primary incubation),持续15分钟。

[0301] 一抗和二抗标记后,处理人IgG同种型对照,仅二抗对照以及测试和阳性对照(0分钟时样品)。细胞用IF缓冲液洗涤两次,然后置于冰上的含4%多聚甲醛(4%在DPBS中半稀释,目录号19943,Affymetrix,加利福尼亚州圣克拉拉)的第二个24孔板中,以停止内化并固定细胞。

[0302] 剩余的细胞用IF缓冲液洗涤两次,各孔添加1mL温热的生长培养基,然后放入37℃培养箱中。在0小时,0.5小时,1小时,2小时,4小时,24小时,如关于对照样品所述,将细胞于冰上的多聚甲醛中固定。

[0303] 所有细胞在冰上保持固定至少15分钟。用IF缓冲液洗涤细胞,并将盖玻片与2-3滴Prolong Gold Anti-Fade试剂加DAPI(目录号P-36931,英杰公司,纽约州格兰德艾兰)一起添加至各孔中作为核负染剂。使用Leica显微镜(Leica DMI600B),Leica单色相机(Leica DFC350FX),DAPI和Alexa Fluor 488滤光片组以及63x油浸镜头获取细胞图像。图像以TIFF格式保存并使用ImageJ进行分析。

[0304] 图14显示人源化抗体Hu_1B3内化到表达SLAMF6的细胞中显著少于临床西雅图遗传学公司的抗体。这表明在与抗体Hu_1B3结合后,受体在细胞表面停留的时间更长,因此将在T细胞中诱导更持久的反应,因此将成为更有效的激动剂。

[0305] 实施例13:细胞毒性试验

[0306] SKBr3 HCT116和MDA-MB-231购自ATCC。按照制造商(ATCC)的指示使用标准无菌技术维持细胞系。细胞培养基由含有2mM L-谷氨酰胺和25mM HEPES(Corning),1%青霉素/链

霉素 (Sigma-Aldrich) 和10%热灭活FCS (HyClone) 的RPMI-1640组成。细胞系保持在指数期,并在含有5%CO₂的37℃培养箱中生长。SKBr3是一种乳腺癌细胞系,它表达高拷贝数的Her2(约5x10⁶拷贝/细胞)。HCT116是一种表达低拷贝数Her2的结肠直肠癌细胞系。MDA-MB-231是一种表达低拷贝数Her2的乳腺癌细胞系。

[0307] 在以下条件下制备靶和效应器 (PBMC) 细胞。在试验前一天,靶细胞用PBS洗涤,用0.25%胰蛋白酶孵育,并重新悬浮在细胞培养基中。通过染料排除法测量活力和细胞浓度。靶细胞以10,000个细胞/孔接种在96孔组织培养处理板中。细胞在5%CO₂的37℃培养箱中生长过夜。

[0308] 在试验前一天,冷冻的PBMC在37℃水浴中解冻,用细胞培养基洗涤,并在37℃培养箱中与5%CO₂培养过夜。第二天,通过染料排除法测量活力和细胞浓度。PBMC以10:1的E:T比添加至靶细胞。10,000个靶细胞与100,000个效应细胞混合。

[0309] 双特异性抗体Cris7-Her2用于细胞毒性试验。该抗体可检测Her2和CD3ε。Cris7-Her2双特异性抗体被稀释至100ng/ml,然后连续稀释3倍至0.0012ng/ml。此外,还测试了Cris7-Her2+激动剂抗体。包括Cris7-Her2双特异性抗体加激动剂抗体的组合以观察激动剂抗体增强的细胞毒性。乌瑞芦单抗 (Urelumab) 是一种针对4-1BB的抗体,用作阳性对照。同种型用作阴性对照。Hu_1B3是测试品。以2.5ug/ml的终浓度使用乌瑞芦单抗,同种型和Hu_1B3。所有样品设三重复运行。对照包括单独的靶细胞或靶细胞加效应细胞。其它对照包括靶细胞和效应细胞加Hu_1B3或靶细胞和效应细胞加同种型对照。

[0310] 取决于细胞系,细胞毒性试验被培养48-96小时。孵育后,测量靶细胞的活力。活力基于ATP的定量,它标志着代谢活性细胞的存在。该试验基于发光,并且 **CellTiter-Glo®** (Promega, 威斯康星州麦迪逊) 是用于测量活细胞的试剂。对于测定条件,遵循制造商的说明,并且所有步骤均在室温下进行。简言之,将96孔板和 **CellTiter-Glo®** 试剂平衡至室温,持续30分钟。30分钟后,除去细胞培养基,用200ul PBS洗涤靶细胞;洗涤步骤再重复一次。接下来,将100ul的 **Cell Titer-Glo®** 试剂添加到所有孔中。将板置于定轨振荡器上并以250rpm混合2分钟以诱导细胞裂解。将板从定轨振荡器取下并在黑暗中孵育10分钟以稳定发光信号。10分钟后,将样品转移到不透明壁的96孔板中并记录发光。

[0311] 靶细胞的活力与产生的发光信号成正比。所有样品设三重复进行,并计算每个试验条件的平均值。将样品的细胞毒性百分比标准化至对照;对照是在效应细胞(靶标+效应物)存在下靶细胞的存活率。为了计算活力,将样品的发光信号除以对照的发光信号。基于剩余的非活细胞的百分比计算细胞毒性。如图15所示,对于SKBr3细胞,单独的双特异性抗体或双特异性抗体加同种型对照在0.8-100ng/ml的较高浓度下具有有效的细胞毒性。乌瑞芦单抗的添加使细胞毒性曲线略微向左移动,但不超过5%。然而,加入2.5ug/ml Hu_1B3将SKBR-3细胞的细胞毒性提高了10%-40%。

[0312] 图16显示在第二个PBMC供体中看到了类似的结果。

[0313] 图17显示Hu_1B3对HCT116细胞的增强的细胞毒性。HCT116细胞是一种结肠癌细胞系,在细胞表面表达低水平的Her2。使用HCT116细胞,与PBMC一起,和T细胞接合双特异性抗体Cris7-Her2进行细胞毒性试验。如上所述,将Hu_1B3添加至试验以确定它是否增强存在于PBMC中的T细胞或NK细胞的功能;T细胞和NK细胞都表达共活化受体SLAMF6。数据显示T细

胞接合双特异性抗体Cris7-Her2在不同测试浓度下的剂量依赖性细胞毒性。更重要的是,数据显示当添加Hu_1B3时,观察到细胞毒性增加。Cris7-Her2双特异性单独或双特异性抗体+同种型对照的EC50约为0.25ng/mL,而双特异性抗体+Hu_1B3的EC50约为0.07ng/ml。这表示细胞毒性增加了约3.6倍。

[0314] 图18显示Hu_1B3对MDA-MB-231细胞的增强的细胞毒性。MDA-MB-231细胞是一种乳腺癌细胞系,在细胞表面表达低水平的Her2。使用MDA-MB-231细胞,和PBMC一起,和T细胞接合双特异性抗体Cris7-Her2进行细胞毒性试验,如上所述。同样,Hu_1B3在各种测试浓度下增强了Cris7-Her2双特异性的细胞毒性。具体而言,与同种型对照相比,在1ng/mL的Cris7下观察到40%的细胞毒性增加。

[0315] 图19显示,孵育96小时后,双特异性和Hu_1B3的组合即使在最低水平的双特异性抗体浓度下也显示出高水平的SKBR-3细胞杀伤。然而,在这些水平下,单独的双特异性或双特异性与乌瑞芦单抗或同种型对照的组合导致非常低的水平或没有细胞杀伤,表明Hu_1B3提供了对淋巴细胞的强活化。

[0316] 图20显示上述细胞毒性试验,其中双特异性Cris 7-Her2抗体被维持在恒定水平(0.0457ng/ml)且测试抗体的浓度通过1/3稀释在7.5ug/ml至0.0034ug/ml的浓度范围中滴定的试验条件下。与乌瑞芦单抗或同种型对照相比,观察到SKBR-3细胞的剂量依赖性杀伤,进一步表明Hu_1B3活化细胞毒性淋巴细胞的能力。

[0317] 实施例14:Cris7双特异性缺失时的细胞毒性试验

[0318] 如上所述设置另一个细胞毒性试验,但是没有使用双特异性抗体。仅使用Hu_1B3,同种型对照和乌瑞芦单抗来测试具有SKBR-3的单一药剂的细胞毒性。测定中使用的浓度范围是33ug/ml-0.13ug/ml,其中一个供体进行1/3稀释。对于第二个供体,测试抗体被进一步稀释至0.0152ug/ml(图21b)。

[0319] 图21a和21b显示在不存在CD3-Her2双特异性抗体时Hu_1B3能够活化淋巴细胞以诱导SKBR-3细胞的细胞杀伤。这与乌瑞芦单抗或同种型对照形成对比,其中几乎没有看到细胞杀伤。

[0320] 序列列表

[0321]

SEQ ID	说明	序列
1	1B3_VH_aa	QVQLKQSGAE LVRPGTSVKV S CKASGYAFT NYLIE EWVKQR PGQGLEWIGV INPGSGGTNY NEKFKDKATL T ADKSSNTAY MQLSSLTSDS SAVY FCARRG WDYFDY WGQG TLTVSS
2	1B3_VL_aa	Q I VLTQSPAL MSTSPGEKVT M CS ASSSVS YIYW FQ QKPG SS PKPW IYRT SN LASGVPAR F SG SGSGT SY SL TISSMEAE DAATY YCQ QW DNNPYT FGG G TKLEIK
3	1B3_VH_nt	CAGGTGCAACTCAAGCAAAGCGGTGCAGAACTGGTGAGACCTGGCACATC AGTCAAGGTGTCATGCAAAGCTAGTGGATACGCCTTCACTAACTACCTGA TTGAGTGGGTGAAGCAAAGACCTGGTCAGGGTCTGGAATGGATTGGAGTG ATCAACCCAGGTAGCGGAGGAAC TAACTACAACGAGAAGTTCAAGGATAA GGCAACTCTGACTGCCGACAAGAGCTCTAACACAGCCTATATGCAACTGT CCAGTCTCACTAGCGATGATTCCGCAGTGTACTTCTGTGCTCGCAGAGGC TGGGACTACTTTGACTACTGGGGTCAAGGA ACTACTCTGACAGTGTCCAG C
4	1B3_VL_nt	CAGATCGTTCTCACCCAGAGTCTTGCAGTGCATCCTCTTCCGTTTCTTACATCTATT GGTCCAGCAGAAGCCAGGGAGCTCACC AAAGCCTTGGATCTACAGAACA TCCAATCTCGCAAGCGGTGTTCCAGCTAGGTT CAGTGGGTCGGGATCAGG CACATCCTACTCTTGACAATCTCCTCCATGGAAGCAGAAGACGCTGCAA CCTACTATTGCCAACAGTGGGACAACAATCCCTACACCTTTGGAGGTGGT ACCAAGCTGGAGATCAAG
5	1B3_VH_CDR1_aa	NYLIE
6	1B3_VH_CDR2_aa	VINPGSGGTNYNEKFKD
7	1B3_VH_CDR3_aa	RGWDYFDY
8	1B3_VL_CDR1_aa	SASSSVSYIY
9	1B3_VL_CDR2_aa	RTSNLAS
10	1B3_VL_CDR3_aa	QQWDNNPYT
11	SLAMF6 (Q96DU3)	MLWLFQSLFLVFCFGPENVVSQSSLTPLMVNGILGESVTLPLEFPAGEKVNFI TWLFFNETSLAFIVPHETKSP EIHVTNPKQGKRLNFTQSYSLQLSNLKMEDT GSYRAQISTKTSAKLSSYTLRILRQLRNIQVTNHSQLFQNMTCELHLTCSVE DADDNVSRWEALGNLTSSQPNTVSWDPRISSEQDYTCIAENAVSNLSFSV SAQKLCEDVKIQYTDTKMILFMVSGICIVFGFIILLLLVLRKRRDLSLSLSTQ RTQGPASARNLEYVSVSPTNNTVYASVTHSNRETEIWTPRENDTITITYSTI NHSKESKPTFSRATALDNVV
12	SLAMF6 ECD (SEQ ID NO: 11 的 aa22 - 226)	QSSLTPLMVNGILGESVTLPLEFPAGEKVNFI TWLFFNETSLAFIVPHETKSP EIHVTNPKQGKRLNFTQSYSLQLSNLKMEDTGSYRAQISTKTSAKLSSYTLR ILRQLRNIQVTNHSQLFQNMTCELHLTCSVEDADDNVSRWEALGNLTSSQP NLTVSWDPRISSEQDYTCIAENAVSNLSFSVSAQKLCEDVKIQYTDTKM
13	1B3_VHBhu aa	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NYLIEWVRQA PGQGLEWIGV INPGSGGTNY NEK FQ GRVTL TADKSISTAY MELSR LR SDD TAVYYCARRG WDYFDYWGQG TLTVSS
14	1B3VLBhu aa	DIQLTQSPSS LSASVGD RV T ITCQASQDVS YIYWY Q QKPG KAPKPW IY RT SN LATGVPSR FSGSGSGTDY TFISS LQ PE DIATY YCQ QW DNNPYT FGG G TKLEIK

15	1B3_VHBhu_CD R2	VINPGSGGTNYNEKFQG
16	1B3_VLBhu_CD R1	QASQDVSYIY
17	1B3_VLBhu_CD R2	RTSNLAT
18	1B3_VHBhu_Fc _aa	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NYLIEWVRQA PGQGLEWIGV INPGSGGTNY NEKFQGRVTL TADKSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARRG WDYFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYV LPFSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
19	1B3_VLBhu_Fc _aa	DIQLTQSPSS LSASVGDVRT ITCQASQDVS YIYWYQQKPG KAPKPWIYRT SNLATGVPSR FSGSGGTDY TFTISSLQPE DIATYYCQQW DNNPYTFGQG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
20	1B3_VHBhu_nt	CAAGTGCAACTGGTGCAATCTGGTGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGTGCTTCCG TCAAGGTTTCTTGTAAAGGCATCTGGTTACGCATTACCAACTATCTCATTGA ATGGGTTAGGCAAGCACCTGGACAAGGACTGGAGTGGATCGGAGTGATCAAC CCAGGTTCTGGAGGCACAACTACAACGAGAAGTTCCAAGGTCGCGTCACAC TCACTGCAGACAAATCCATTTCTACAGCTACATGGAGCTGTCTCGCCTCCG CTCCGATGACACTGCTGTGTACTACTGCGCTCGCAGAGGTTGGGACTACTTC GACTACTGGGGTCAAGGTACCCTCGTTACAGTGTCCAGC
[0322]	1B3_VLBhu_nt	GACATCCAACACTGACTCAATCTCCATCTAGCCTGTCTGCATCCGTTGGTGATA GGGTCATATCACATGCCAAGCATCTCAAGACGTGAGCTACATCTATTGGTA TCAACAGAAACCCGGTAAGGCTCCTAAACCTTGGATCTACAGGACATCTAAT CTGGCCACTGGTGTTCCTTCTCGCTTCTCTGGCAGCGGTAGCGGAACCGACT ACACTTTCACCATCAGCTCTCTCCAACCTGAAGACATTGTACTACTACTG TCAGCAATGGGATAACAACCCATACACCTTTGGACAAGGTACCAAGCTGGAG ATCAAG
22	1B3_VHB_Fc_n t	CAAGTGCAACTGGTGCAATCTGGTGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGTGCTTCCG TCAAGGTTTCTTGTAAAGGCATCTGGTTACGCATTACCAACTATCTCATTGA ATGGGTTAGGCAAGCACCTGGACAAGGACTGGAGTGGATCGGAGTGATCAAC CCAGGTTCTGGAGGCACAACTACAACGAGAAGTTCCAAGGTCGCGTCACAC TCACTGCAGACAAATCCATTTCTACAGCTACATGGAGCTGTCTCGCCTCCG CTCCGATGACACTGCTGTGTACTACTGCGCTCGCAGAGGTTGGGACTACTTC GACTACTGGGGTCAAGGTACCCTCGTTACAGTGTCCAGCGTAGCACCAAGG GCCCATCCGTTTTCCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAATCAACCAGCGGTGGCAC AGCAGCCCTGGGATGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTCACCGTC TCCTGGAACCTCCGGCGCACTCACCTCCGGCGTCCACACCTTCCCCCGCTTC TGCAGAGTTCTGGCCTGTACAGTCTGAGTTCCTGGTGGTACCGTCCCATCCTC CTCCCTCGGGACCCAGACCTACATTTGTAATGTTAATCACAAGCCATCAAAC ACCAAAGTGGATAAGAAGGTCGAACCTAAAAGCTGCGACAAGACTCACACCT GCCACCCTGCCCGCACCAGAAGCTGCAGGTGGCCCTCAGTTTTCTCTGTT CCCACCAAAGCCCCAAAGATACCCTCATGATCTCAAGAACCCAGAGGTCACC TGCGTCGTCTGACGTGTACACGAAGATCCCAGAGTCAAGTTAATTGGT ATGTTGATGGGGTCAAGTGCATAACGCCAAAACAAAACCCCGCAAGAGCA GTATAACAGCACTTACAGAGTTGTTTTCCGTTCTGACAGTGTCCACCAGGAT TGGCTGAATGGTAAGGAGTACAAATGCAAGGTGTCTAACAAGGCTCTGCCAG CCCCTATTGAGAAAACCATAGCAAGGCCAAGGGTCAGCCAGGGAGCCACA GGTGTATAACCTCCCACCTTACGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAAT CTCACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAAGCGATATTGCTGTGGAATGGG AATCTAACGGGCAGCCTGAAAATAACTACAAGACCACACCACAGTGTCTCGA TTCCGACGGTAGCTTCTTCTGTATTCCAAACTGACCGTGGACAAAAGCAGA TGGCAGCAGGGAAATGTGTTAGTTCAGTTGTAGCGTGTGATGAGCCCTCCACA ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTAAG

[0323]

23	1B3_VLB_Fc_n t	GACATCCAAGTACTCAATCTCCATCTAGCCTGTCTGCATCCGTTGGTGATA GGGTCACATATCACATGCCAAGCATCTCAAGACGTGAGCTACATCTATTGGTA TCAACAGAAACCCGGTAAGGCTCCTAACCTTGGATCTACAGGACATCTAAT CTGGCCACTGGTGTTCCTTCTCGCTTCTCTGGCAGCGGTAGCGGAACCGACT ACACTTTACCATCAGCTCTCTCCAACCTGAAGACATTGCTACCTACTACTG TCAGCAATGGGATAACAACCCATACACCTTTGGACAAGGTACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACAGTGGCTGCACCTAGTGTGTTTCATCTTCCCTCCTTCCGATG AGCAACTGAAGAGCGGAACCGCCAGTGTGTCTGTCTGCTGAACAACCTCTA CCCTCGGGAAGCCAAAGTTCAGTGGAAAGTCGACAACGCTCTGCAATCCGGC AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACATATAGTC TGTCTCTACTCTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAGCACAAAGTGTA CGCTTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGTCCAGTCCCCTTACCAAGAGCTTC AATAGAGGAGAATGT
----	-------------------	---

序列表

<110> 牛津生物疗法有限公司 (Oxford BioTherapeutics Ltd)

<120> 抗体和使用方法

<130> P1125PC00

<150> US62/870269

<151> 2019-07-03

<150> US62/965450

<151> 2020-01-24

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 1

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Thr Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30
 Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Asn Asn Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3

<211> 351

<212> DNA

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 3

cagggtgcaac tcaagcaaag cgggtgcagaa ctggtgagac ctggcacatc agtcaaggtg 60
 tcatgcaaag ctagtggata cgccttact aactacctga ttgagtgggt gaagcaaaga 120
 cctggtcagg gtctggaatg gattggagtg atcaaccag gtagcggagg aactaactac 180
 aacgagaagt tcaaggataa ggcaactctg actgccgaca agagctctaa cacagcctat 240
 atgcaactgt ccagtctcac tagcgatgat tccgcagtgt acttctgtgc tcgagaggc 300
 tgggactact ttgactactg gggtaagga actactctga cagtgtccag c 351

<210> 4

<211> 318

<212> DNA

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 4

cagatcgttc tcaccagag tctgcaactg atgtcaaca gccctggcga gaaagttaca 60
 atgacttgca gtgcatctc ttcgtttct tacatctatt ggttccagca gaagccaggg 120
 agctcaccaa agccttggat ctacagaaca tccaatctcg caagcgggtg tccagctagg 180
 ttcagtgggt ccgatcagg cacatctac tctctgaca tctctccat ggaagcagaa 240
 gacgctgcaa cctactattg ccaacagtgg gacaacaatc cctacacctt tggaggtggt 300
 accaagctgg agatcaag 318

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 5

Asn Tyr Leu Ile Glu

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 6

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 7

Arg Gly Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 8

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 9

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 10

Gln Gln Trp Asp Asn Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 332
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 11
 Met Leu Trp Leu Phe Gln Ser Leu Leu Phe Val Phe Cys Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Gly Asn Val Val Ser Gln Ser Ser Leu Thr Pro Leu Met Val Asn Gly
 20 25 30
 Ile Leu Gly Glu Ser Val Thr Leu Pro Leu Glu Phe Pro Ala Gly Glu
 35 40 45
 Lys Val Asn Phe Ile Thr Trp Leu Phe Asn Glu Thr Ser Leu Ala Phe
 50 55 60
 Ile Val Pro His Glu Thr Lys Ser Pro Glu Ile His Val Thr Asn Pro
 65 70 75 80
 Lys Gln Gly Lys Arg Leu Asn Phe Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Gln Leu
 85 90 95
 Ser Asn Leu Lys Met Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Arg Ala Gln Ile Ser
 100 105 110
 Thr Lys Thr Ser Ala Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Leu Arg Ile Leu Arg
 115 120 125
 Gln Leu Arg Asn Ile Gln Val Thr Asn His Ser Gln Leu Phe Gln Asn
 130 135 140
 Met Thr Cys Glu Leu His Leu Thr Cys Ser Val Glu Asp Ala Asp Asp
 145 150 155 160
 Asn Val Ser Phe Arg Trp Glu Ala Leu Gly Asn Thr Leu Ser Ser Gln
 165 170 175
 Pro Asn Leu Thr Val Ser Trp Asp Pro Arg Ile Ser Ser Glu Gln Asp
 180 185 190
 Tyr Thr Cys Ile Ala Glu Asn Ala Val Ser Asn Leu Ser Phe Ser Val
 195 200 205
 Ser Ala Gln Lys Leu Cys Glu Asp Val Lys Ile Gln Tyr Thr Asp Thr
 210 215 220
 Lys Met Ile Leu Phe Met Val Ser Gly Ile Cys Ile Val Phe Gly Phe
 225 230 235 240
 Ile Ile Leu Leu Leu Leu Val Leu Arg Lys Arg Arg Asp Ser Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Thr Gln Arg Thr Gln Gly Pro Ala Glu Ser Ala Arg Asn Leu
 260 265 270
 Glu Tyr Val Ser Val Ser Pro Thr Asn Asn Thr Val Tyr Ala Ser Val

275	280	285
Thr His Ser Asn Arg Glu Thr Glu Ile Trp Thr Pro Arg Glu Asn Asp		
290	295	300
Thr Ile Thr Ile Tyr Ser Thr Ile Asn His Ser Lys Glu Ser Lys Pro		
305	310	315
Thr Phe Ser Arg Ala Thr Ala Leu Asp Asn Val Val		
	325	330
<210> 12		
<211> 205		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 12		
Gln Ser Ser Leu Thr Pro Leu Met Val Asn Gly Ile Leu Gly Glu Ser		
1	5	10
Val Thr Leu Pro Leu Glu Phe Pro Ala Gly Glu Lys Val Asn Phe Ile		
	20	25
Thr Trp Leu Phe Asn Glu Thr Ser Leu Ala Phe Ile Val Pro His Glu		
	35	40
Thr Lys Ser Pro Glu Ile His Val Thr Asn Pro Lys Gln Gly Lys Arg		
	50	55
Leu Asn Phe Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Gln Leu Ser Asn Leu Lys Met		
65	70	75
Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Arg Ala Gln Ile Ser Thr Lys Thr Ser Ala		
	85	90
Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Leu Arg Ile Leu Arg Gln Leu Arg Asn Ile		
	100	105
Gln Val Thr Asn His Ser Gln Leu Phe Gln Asn Met Thr Cys Glu Leu		
	115	120
His Leu Thr Cys Ser Val Glu Asp Ala Asp Asp Asn Val Ser Phe Arg		
	130	135
Trp Glu Ala Leu Gly Asn Thr Leu Ser Ser Gln Pro Asn Leu Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asp Pro Arg Ile Ser Ser Glu Gln Asp Tyr Thr Cys Ile Ala		
	165	170
Glu Asn Ala Val Ser Asn Leu Ser Phe Ser Val Ser Ala Gln Lys Leu		
	180	185
Cys Glu Asp Val Lys Ile Gln Tyr Thr Asp Thr Lys Met		
	195	200
<210> 13		

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Asn Asn Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化CDR序列

<400> 15

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化CDR序列

<400> 16

Gln Ala Ser Gln Asp Val Ser Tyr Ile Tyr
 1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化CDR序列

<400> 17

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Thr
 1 5

<210> 18

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体序列

<400> 18

115	120	125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
130	135	140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
145	150	155
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
180	185	190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys		

210

<210> 20

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体序列

<400> 20

caagtgaac tggtgcaatc tggtgctgaa gtcaagaagc ctggtgcttc cgtaaggtt 60
tcttgtaagg catctggta cgcattcacc aactatctca ttgaatgggt taggcaagca 120
cctggacaag gactggagtg gatcggagtg atcaaccag gttctggagg cacaaactac 180
aacgagaagt tccaaggtcg cgtcacactc actgcagaca aatccatttc tacagcctac 240
atggagctgt ctcgctccg ctccgatgac actgctgtgt actactgcgc tcgagaggt 300
tgggactact tcgactactg gggtaaggt accctcgta cagtgtccag c 351

<210> 21

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体序列

<400> 21

gacatccaac tgactcaate tccatctage ctgtctgcat ccgttggtga tagggtcact 60
atcacatgcc aagcatctca agacgtgagc tacatctatt ggtatcaaca gaaaccgggt 120
aaggtccta aacctggat ctacaggaca tetaatctgg ccaactggtgt tccttctcgc 180
ttctctggca gcggtagcgg aaccgactac actttacca tcagctctct ccaacctgaa 240
gacattgcta cctactactg tcagcaatgg gataacaacc catacacctt tggacaaggt 300
accaagctgg agatcaag 318

<210> 22

<211> 1341

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体序列

<400> 22

caagtgcaac tggtgcaatc tgggtgctgaa gtcaagaagc ctggtgcttc cgtcaaggtt 60
 tcttgtaagg catctgggta cgcattcacc aactatctca ttgaatgggt taggcaagca 120
 cctggacaag gactggagtg gatcggagtg atcaaccag gttctggagg cacaaactac 180
 aacgagaagt tccaaggtcg cgtcacactc actgcagaca aatccatttc tacagcctac 240
 atggagctgt ctgcctccg ctccgatgac actgctgtgt actactgcgc tcgcagaggt 300
 tgggactact tcgactactg ggggtcaaggt accctcgta cagtgtccag cgctagcacc 360
 aagggcccat ccgttttccc tctggetcct agctccaaat caaccagcgg tggcacagca 420
 gccctgggat gtctcgtgaa ggactacttc cccgagcccc tcaccgtctc ctggaactcc 480
 ggcgcactca cctccggcgt ccacaccttt cccgccgttc tgcagagttc tggcctgtac 540
 agtctgagtt ccgtgggtgac cgtcccatcc tctcctctg ggaccagac ctacatttgt 600
 aatgttaatc acaagccatc aaacaccaa gtggataaga aggtcgaacc taaaagctgc 660
 gacaagactc acacctgccc accctgcccc gcaccagaag ctgcaggtgg cccctcagtt 720
 ttctgttcc caccaaagcc caaagatacc ctcatgatct caagaacccc agaggtcacc 780
 tgcgtcgtcg tcgacgtgtc acacgaagat cccgaagtca agtttaattg gtatgttgat 840
 ggggtcgaag tgcataacgc caaaacaaa ccccgcaag agcagtataa cagcacttac 900
 agagttgttt ccgttctgac agtgtctccac caggattggc tgaatggtaa ggagtacaaa 960
 tgcaaggtgt ctaacaaggc tctgccagcc cctattgaga aaaccataag caaggccaag 1020
 ggtcagccca gggagccaca ggtgtatacc ctcccactt cacgggatga gctgaccaag 1080
 aaccaagtga gtctcacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgatat tgctgtggaa 1140
 tgggaatcta acgggcagcc tgaataaac tacaagacca caccaccagt gctcgattcc 1200
 gacggtagct tctttctgta ttccaaactg accgtggaca aaagcagatg gcagcaggga 1260
 aatgtgttca gttgtagcgt gatgcatgag gccctccaca accactacac acagaagagc 1320
 ctctccctgt ctcccggtaa g 1341

<210> 23

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体序列

<400> 23

gacatccaac tgactcaatc tccatctagc ctgtctgcat ccgttggtga tagggtcact 60
 atcacatgcc aagcatctca agacgtgagc tacatctatt ggtatcaaca gaaaccgggt 120

aaggctccta aaccttggat ctacaggaca tctaactctgg ccaactgggtgt tccttctcgc 180
ttctctggca gcggtagcgg aaccgactac actttcacca tcagctctct ccaacctgaa 240
gacattgcta cctactactg tcagcaatgg gataacaacc catacacctt tggacaaggt 300
accaagctgg agatcaagag aacagtggct gcacctagtg tgttcatctt ccctccttcc 360
gatgagcaac tgaagagcgg aaccgccagt gttgtctgtc tgctgaacaa cttctaccct 420
cggaagcca aagttcagtg gaaagtcgac aacgctctgc aatccggcaa ctcccaggag 480
agtgtcacag agcaagattc caaggactcc acatatagtc tgcctctac tctgactctg 540
agcaaggctg actacgagaa gcacaaagtg tacgcttgcg aagtgcaca tcaaggcctg 600
tccagtcccg ttaccaagag cttcaataga ggagaatgt 639

1B3 VH 链, SEQ ID NO:1

QVQLKQSGAE LVRPGTSVKV SCKASGYAFT NYLIEWVKQR PGQGLEWIGV INPGSGGTNY
NEKFKDKATL TADKSSNTAY MQLSSLTSDS SAVYFCARRG WDYFDYWGQG TLTIVSS

图1a

1B3 VH 链, SEQ ID NO:2

QIVLTQSPAL MSTSPGKVT MTCSSASSVS YIYWFQOKPG SSPKPWIYRT SNLASGVPAR
FSGSGSTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW DNNPYTFGGG TKLEIK

图1b

1B3(人源化) VH 链, SEQ ID NO:13

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NYLIEWVRQA PGQGLEWIGV INPGSGGTNY
NEKFGGRVTL TADKSISTAY MELSLRSDD TAVYYCARRG WDYFDYWGQG TLTIVSS

图2a

1B3(人源化) VL 链, SEQ ID NO:14

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDVS YIYWFYQOKPG KAPKPWIYRT SNLATGVPSR
FSGSGSTDY TFTISSLQPE DIATYYCQQW DNNPYTFGGG TKLEIK

图2b

Mu 1	QVQLKQSGAELVRPGTSVKV SCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGV	50
	. .:.: . .	
Hu 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV	50
51	INPGSGGTNYNEKFKDKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDS SAVYFCARRG	100
51	INPGSGGTNYNEKFGGRVTLTADKSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARRG	100
101	WDYFDYWGQGTTLTVSS	117
101	WDYFDYWGQGTTLTVSS	117

图3a

```

Mu 1  QIVLTQSPALMSTSPGKVTMTCSASSSVSYIYWFAQKPGSSPKPWIYRT  50
      .|.|||||:..|.|.|:|:|:|.|.|.|||||:|||||:|||||
Hu 1  DIQLTQSPSSLASVGDVRTITCQASQDVSYIYWYQQKPGKAPKWIYRT  50

51  SNLASGVPARFSGSGSGLTSSMEAEADAATYYCQWDNNPYTFGGG  100
      |||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
51  SNLATGVPSRFSGSGSDYFTISSLQPEDATYYCQWDNNPYTFGGG  100

101 TKLEIK  106
      |||||
101 TKLEIK  106
    
```

图3b

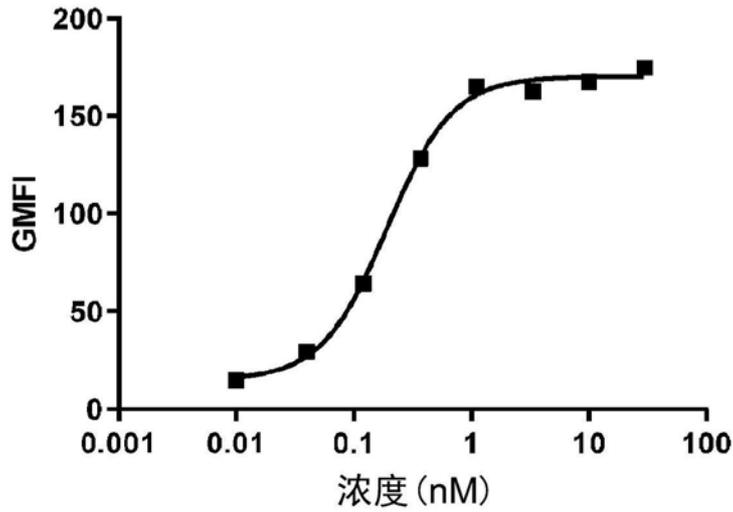


图4

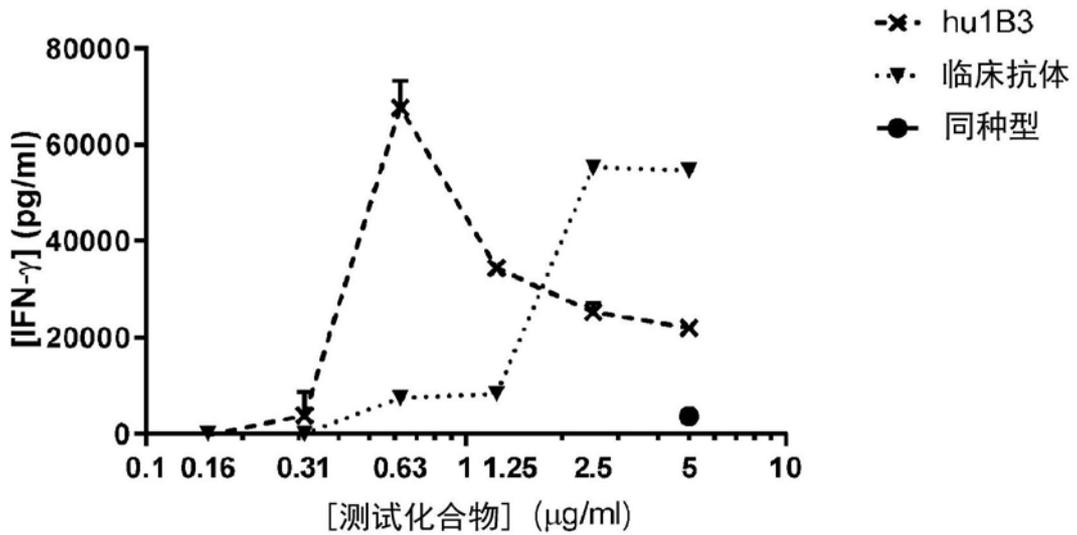


图5

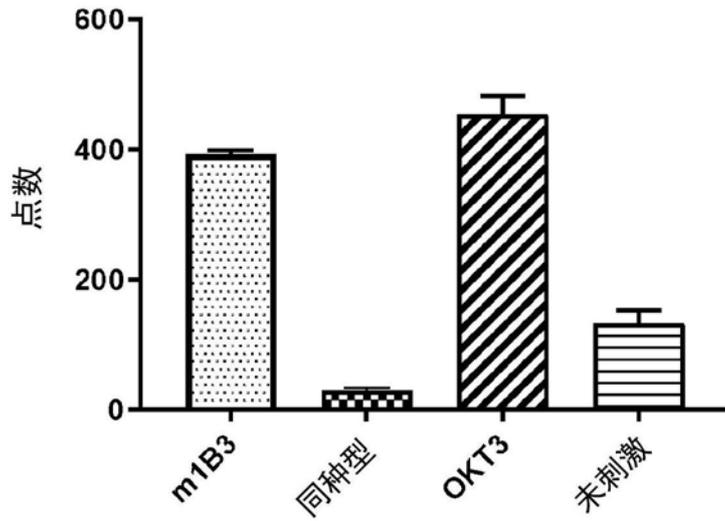


图6

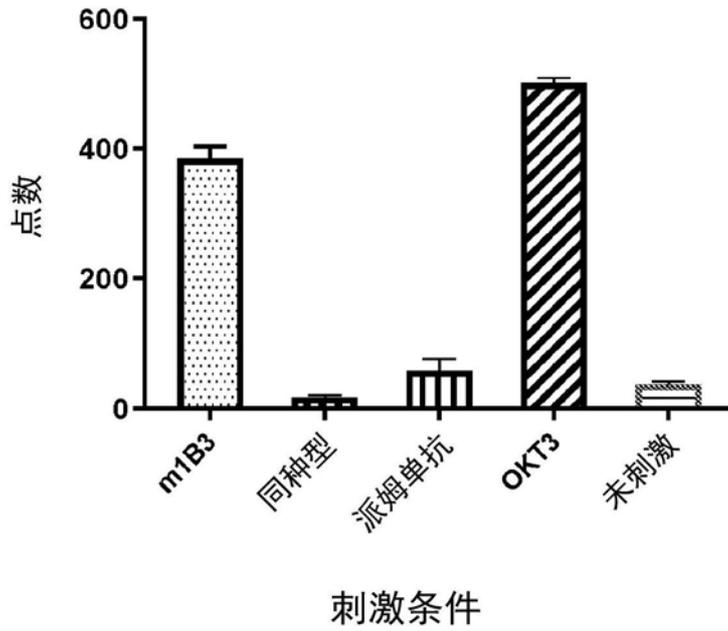


图7

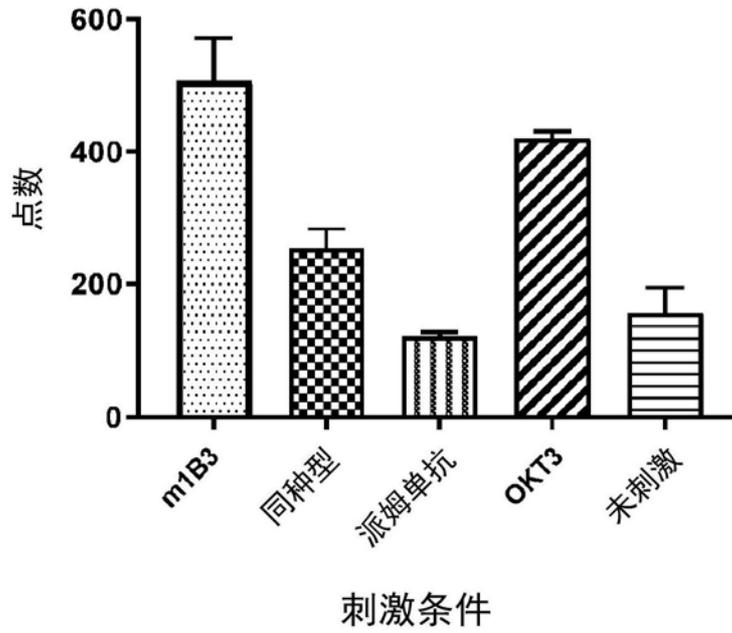


图8

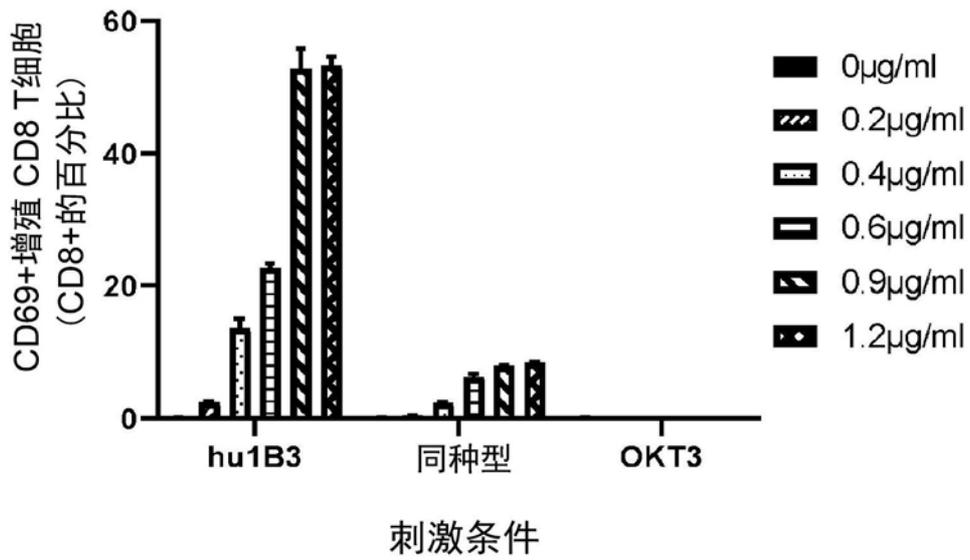


图9

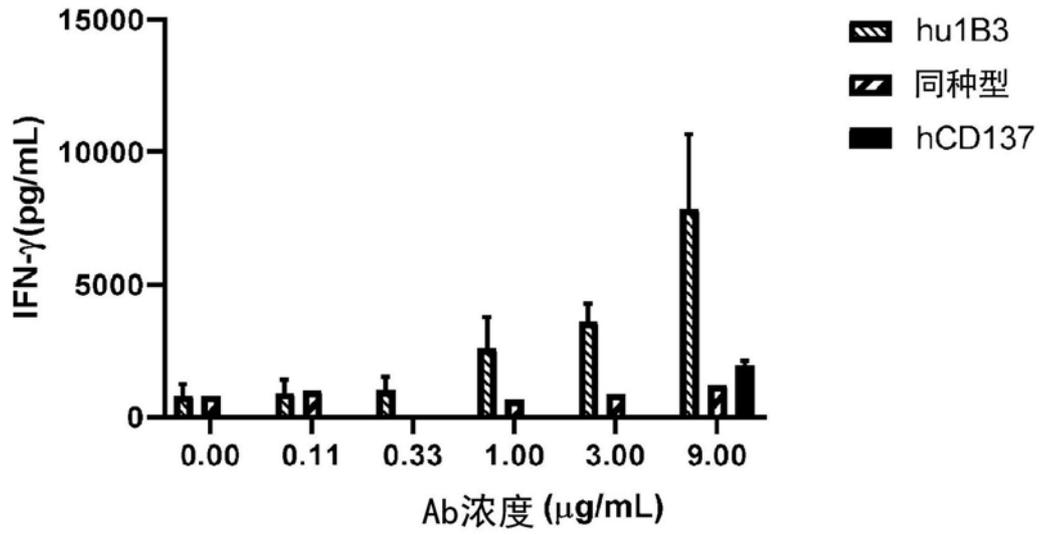


图10

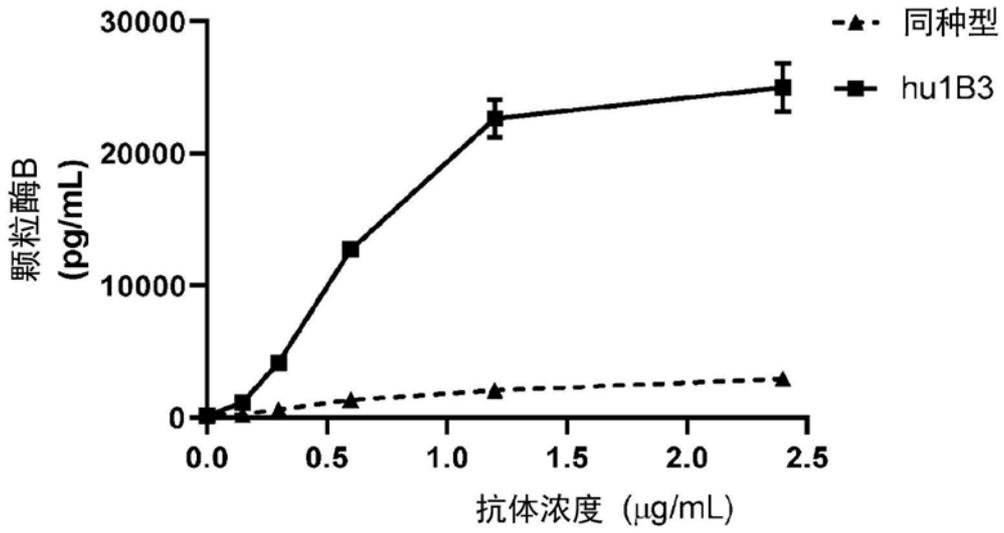


图11

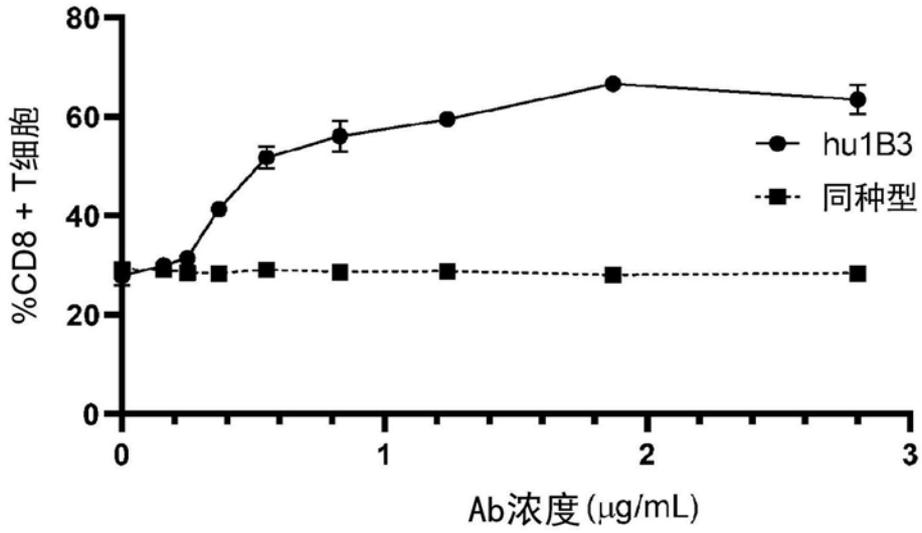


图12

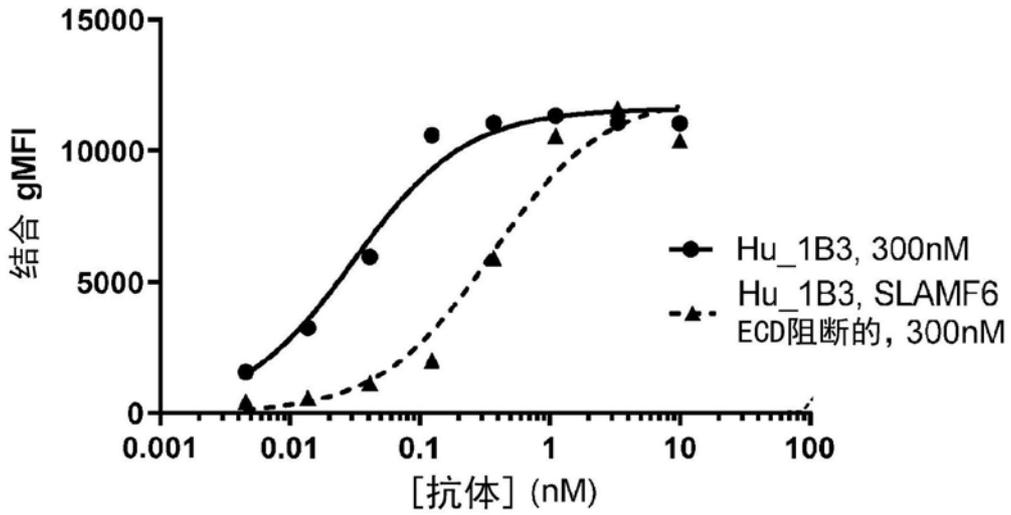


图13

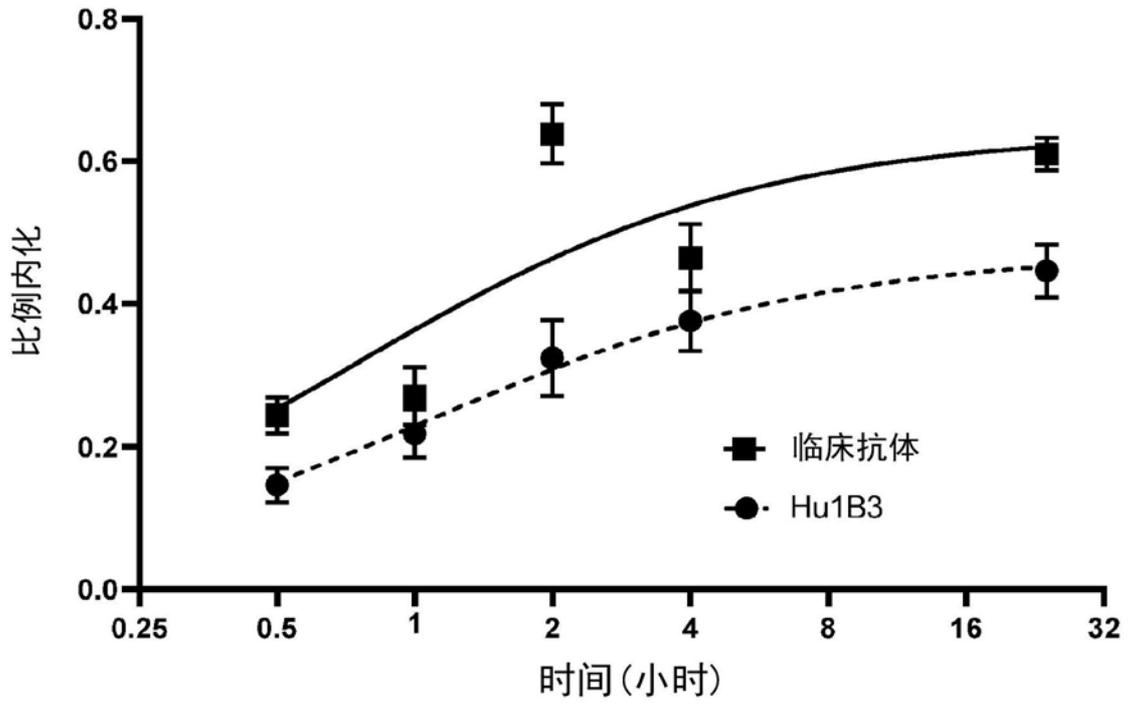


图14

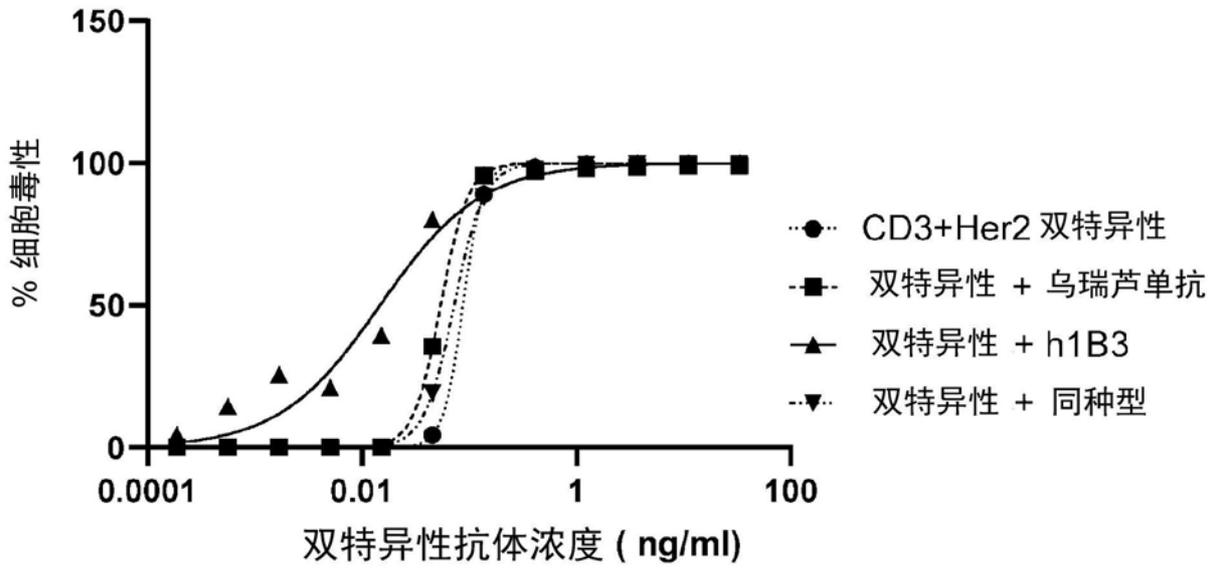


图15

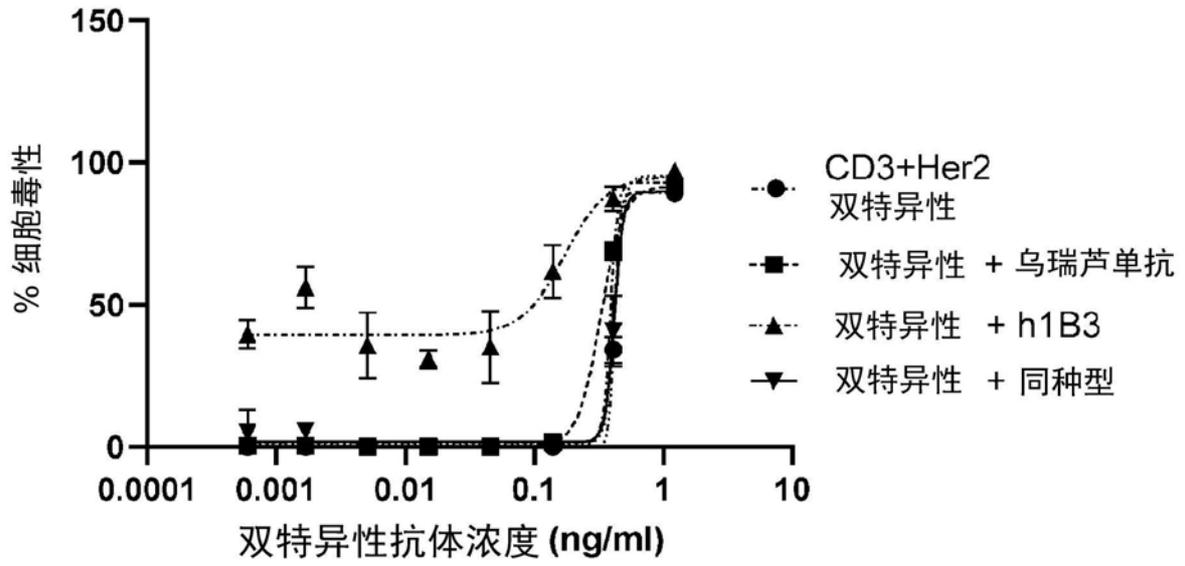


图16

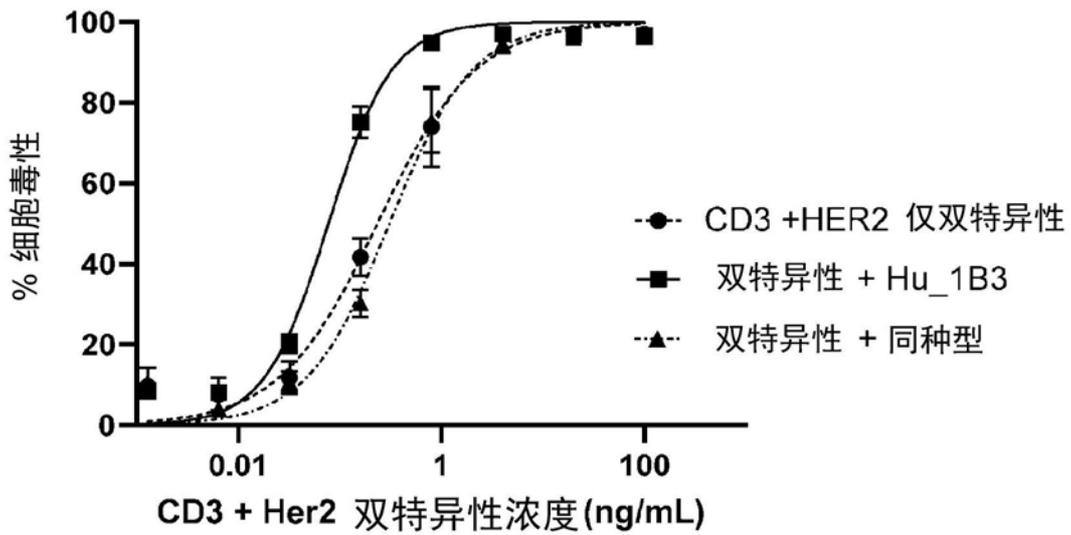


图17

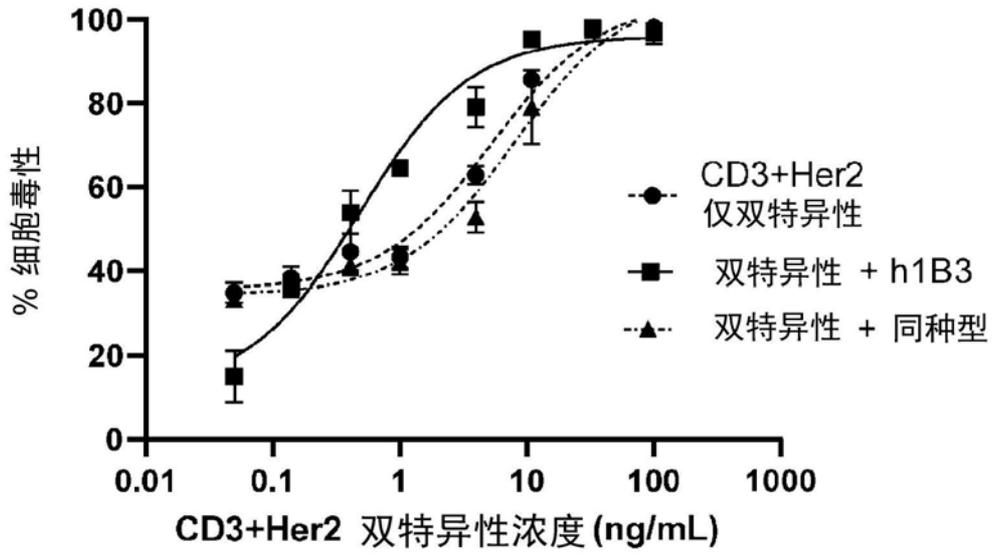


图18

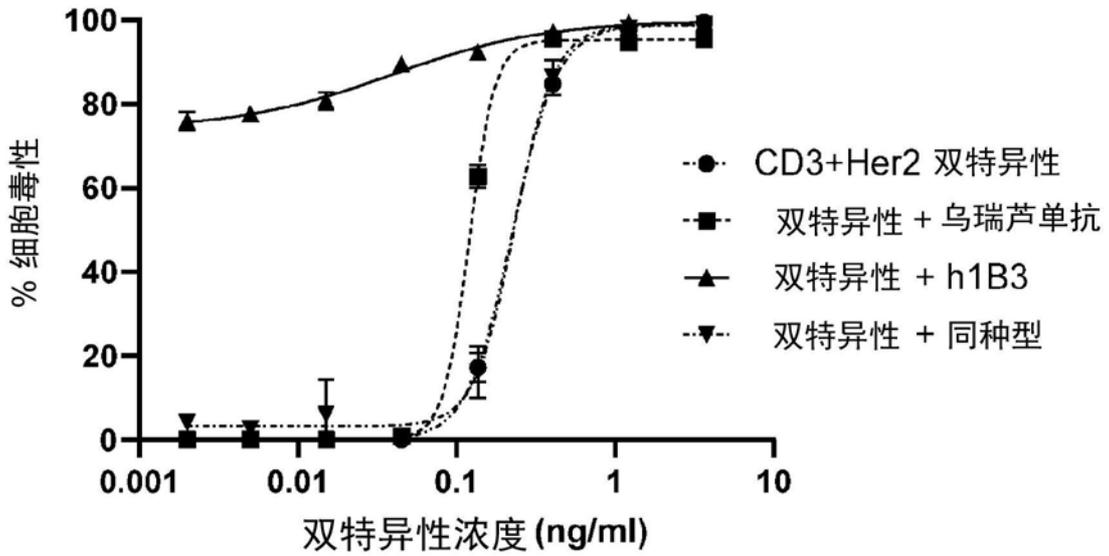


图19

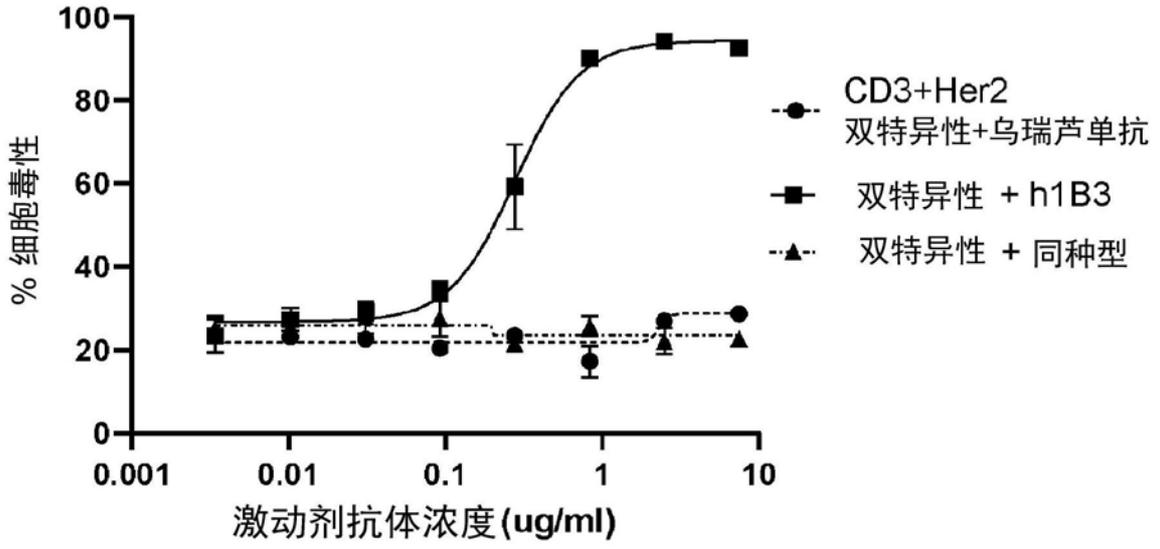


图20

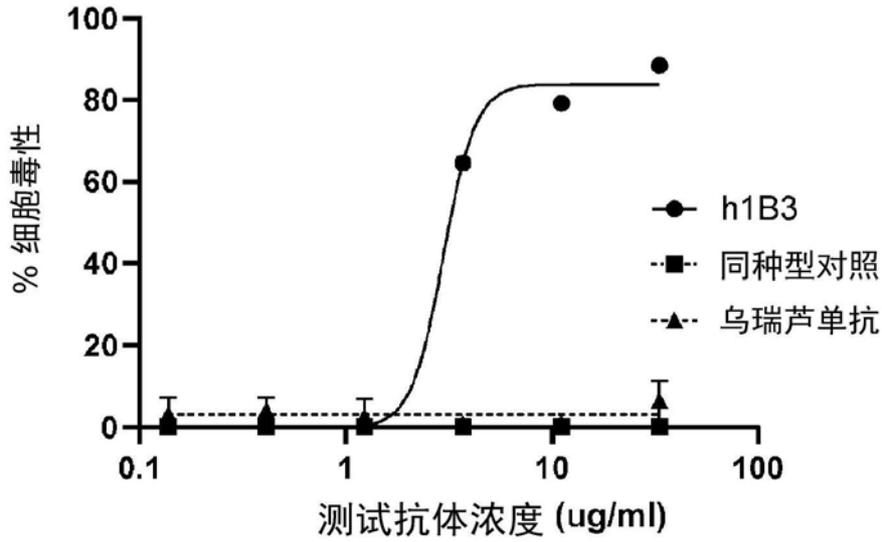


图17a

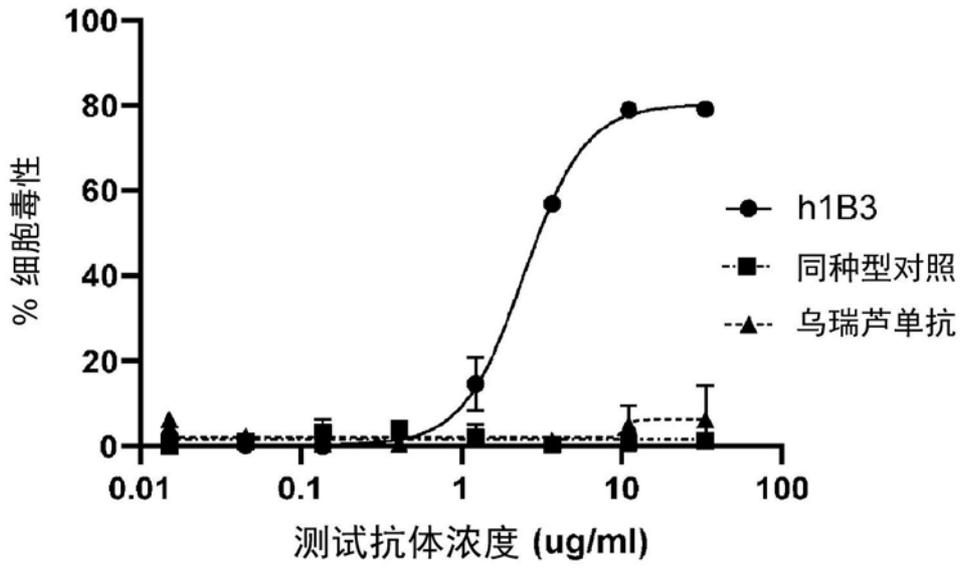


图17b